

**Die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p-Kinase ist notwendig  
zur Aktivierung von prä-katalytischen Spleißosomen**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Claudia Bottner

aus Kaufbeuren

1. Referent:	Prof. Dr. N. F. Käufer
2. Referent:	Prof. Dr. J. Bode
eingereicht am:	21.11.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am:	20.01.2006
Druckjahr:	2006

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Norbert F. Käufer, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Bottner C.A., Schmidt H., Vogel S., Michele M., Käufer N.F. (2005). Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* **48(3)**: 151-161

### **Tagungsbeiträge**

Bottner C.A., Richert K., Kuhn A.N., Käufer N.F. (2002). Functional analysis of the *S. pombe* pre-mRNA splicing factor Cdc5p. 7th annual meeting of the RNA society. 28. 05. – 02. 06.2002. Madison, Wisconsin; USA

Bottner C.A., Kuhn A.N., Käufer N.F. (2003). Prp4p kinase activates an assembled spliceosome *in vivo* using Prp1p as a target. 8th annual meeting of the RNA society. 01. – 06. 07.2003. Vienna, Austria

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	1
<b>2 Einleitung</b>	3
<b>3 Ergebnisse</b>	10
3.1 Nachweis spleißosomaler Komplexe in Zellextrakt	10
3.1.1 In wachsenden Zellen finden sich nur wenig freie U4 snRNPs	11
3.1.2 Prp1p ist mit U-snRNAs assoziiert, die Prp4p-Kinase nicht	12
3.1.3 Prp1p und Cdc5p liegen nicht in dem gleichen Komplex vor	14
3.1.4 Prp1p und Prp31p assoziieren mit den gleichen snRNAs	14
3.2 Verteilung von Prp1p und Prp31p im Dichtegradienten	16
3.3 Prp1p akkumuliert bei 36°C im niedrigen S-Bereich	18
3.4 Die Prp4-Kinaseaktivität hat keinen Einfluss auf die U-snRNA Zusammen- setzung der Prp1/Prp31p Komplexe	21
3.5 Prp1p ist für den Aufbau prä-katalytischer Spleißosomen nicht essentiell	26
3.6 Welche Rolle spielt der N-Terminus von Prp1p ?	31
3.7 Eine unerwartete regulatorische Reaktion nach Repression von <i>nmt81prp1<sup>+</sup></i> und konstitutiver Expression von <i>prp1<sup>+</sup></i>	36
3.8 Identifizierung der <i>in vitro</i> Phosphorylierungsstellen von Prp1p	39
3.9 Auswirkungen von Punktmutationen im N-Terminus von Prp1p auf Wachstum und Assoziation mit spleißosomalen Komplexen	43
<b>4 Diskussion</b>	46
<b>5 Material und Methoden</b>	52
5.1 Geräte	52
5.2 Chemikalien	52
5.3 Kulturmedien	55
5.4 Stämme	55
5.4.1 Verwendete <i>S. pombe</i> Stämme	55
5.4.2 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	57
5.5 Vektoren	57
5.5.1 pREP42MH / pREP42HA	57
5.5.2 pUR19 / pUR19 $\Delta$ ars	58
5.5.3 pSZEnmt81	61
5.5.4 M13mp18	63
5.5.5 Der QIAexpressionist™	64
5.5.6 Das Glutathion-S-Transferase Expressionssystem	66

5.6 Konstruktion eines Stammes mit <i>nmt81HAprp1<sup>+</sup></i> - und <i>Myc-prp1<sup>+</sup></i> Allel	67
5.7 DNA Methoden	70
5.7.1 Transformation von <i>E. coli</i>	70
5.7.2 Plasmid-DNA Isolierung aus <i>E. coli</i>	70
5.7.3 Transformation von <i>S. pombe</i>	71
5.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	71
5.7.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	72
5.7.6 Ligation von DNA	72
5.7.7 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	72
5.7.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	73
5.7.9 Sanger Sequenzierung	73
5.8 RNA Methoden	74
5.8.1 Solution Hybridisation	74
5.8.2 Markierung der Oligonukleotide für die Solution Hybridisation	74
5.8.3 RNA Isolierung aus <i>S. pombe</i>	75
5.8.4 Auftrennung von RNA im Agarosegel	75
5.8.5 Northern Blot	76
5.8.6 Radioaktive Markierung von DNA	76
5.8.7 Hybridisierung der RNA	76
5.9 Biochemische Methoden	77
5.9.1 Native Proteinextraktion aus <i>S. pombe</i>	77
5.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford	77
5.9.3 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)	77
5.9.4 Western Blot	78
5.9.5 Immunpräzipitation mit ProteinA Sepharose (PAS)	79
5.9.6 Glycerolgradientenzentrifugation	79
5.9.7 Acetonfällung von Proteinen	80
5.10 Densitometrische Quantifizierung von Proteinen	80
5.11 Gerichtete Mutagenese von <i>prp1</i>	81
5.12 Aufreinigung von in <i>E. coli</i> exprimierten Proteinen	82
5.12.1 Expression und Aufreinigung von Prp4p	82
5.12.2 Expression und Aufreinigung von His <sub>6</sub> -Prp1p	83
5.13 Kinaseassay	85
5.14 Phosphopeptidmap von Prp1p	85

<b>6 Literatur</b>	87
<b>7 Anhang</b>	98
7.1 Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung	98
7.1.1 Stamm AK038 und AK057 (Abb. 3.13)	98
7.1.2 Stamm 425 (Abb. 3.20)	99
7.1.3 Stamm 453 und 470 (Abb. 3.25)	99
7.2 Aminosäuresequenz von Prp1p	101

## Abkürzungen

acc. no.	accession number
amp	Ampicillin
ars	autonome Replikationssequenz
bp	Basenpaar
cdc	<u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle
D	Dalton
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
GST	<u>G</u> lutathion <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
HA	Influenza <u>H</u> emagglutinin Peptid
kb	Kilobase
lac	Lactose
leu	Leucin
M	Molarität
Myc	humanes p62-c- <u>M</u> yc Peptid
nmt	<u>n</u> o <u>m</u> essage in <u>t</u> hiamine
OD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung
prp	<u>p</u> re-m <u>R</u> NA <u>p</u> rocessing
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
TPR	tetratricopeptide repeat
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

### 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird untersucht, welche Rolle die Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase im Spleißprozess spielt.

Dafür wurde zuerst bestimmt an welchen spleißosomalen Komplexen Prp1p und Prp31p *in vivo* zu finden sind, wenn die Prp4p-Kinase in der Zelle aktiv bzw. nicht aktiv ist. Diese Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass Prp1p und Prp31p unabhängig von der Prp4p-Kinaseaktivität an prä-katalytische Komplexe gebunden sind, die entweder alle fünf snRNAs (U1.U2.U5.U4/U6) oder nur vier snRNAs (U2.U5.U4/U6) enthalten. Sehr überraschend war das Ergebnis, dass in *S. pombe* Prp1p nicht für den Aufbau von Spleißosomen benötigt wird. Diese Beobachtung basiert auf Untersuchungen mit einer konditional letalen *prp1*-Mutante, in der die Expression von Prp1p abgeschaltet werden kann. In dieser Mutante wird Prp31p in prä-katalytischen Komplexen mit U1.U2.U5.U4/U6 und U2.U5.U4/U6 in gleichen Mengen wie unter permissiven Bedingungen nachgewiesen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass in *S. pombe* Spleißosomen unabhängig von Prp1p aufgebaut werden. Sie sind ein Hinweis auf eine regulatorische Funktion der Phosphorylierung von Prp1p bei der Aktivierung des Spleißosoms.

Die Analysen von Deletionsmutationen im N-Terminus von Prp1p *in vivo* ergaben, dass die strukturelle Integrität des N-Terminus für die Funktion von Prp1p essentiell ist. Es zeigte sich dabei, dass der N-Terminus für die Assoziation mit prä-katalytischen Spleißosomen keine wesentliche Rolle spielt.

Deshalb wurden im N-Terminus von Prp1p *in vitro* Phosphorylierungsstellen der Prp4p-Kinase bestimmt. Dazu wurden Punktmutationen im N-Terminus von Prp1p gesetzt. Die mutierten Prp1p Moleküle wurden mit rekombinanter Prp4p-Kinase inkubiert und danach die Phosphopeptide von Prp1p analysiert. Es wurden mehrere *in vitro* Phosphorylierungsstellen identifiziert. Das Threonin in Position 244 im N-Terminus wird auch *in vivo* phosphoryliert. Die zweite *in vivo* Phosphorylierungsstelle konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Die anschließenden Analysen der Punktmutationen *in vivo* bestätigen, dass weder die hochkonservierte Region in den Positionen 20-33 im N-Terminus von Prp1p, noch die Phosphorylierung des Threonins an Position 244 für die Assoziation von Prp1p mit prä-katalytischen Spleißkomplexen notwendig sind. Das ist ein weiterer



Hinweis, dass die Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase an prä-katalytischen Spleißosomen erfolgt.

Auf dieser Grundlage wird ein Modell für die Regulation des prä-mRNA Spleißens *in vivo* vorgeschlagen, in dem die Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase an der Aktivierung von prä-katalytischen Spleißosomen beteiligt ist.

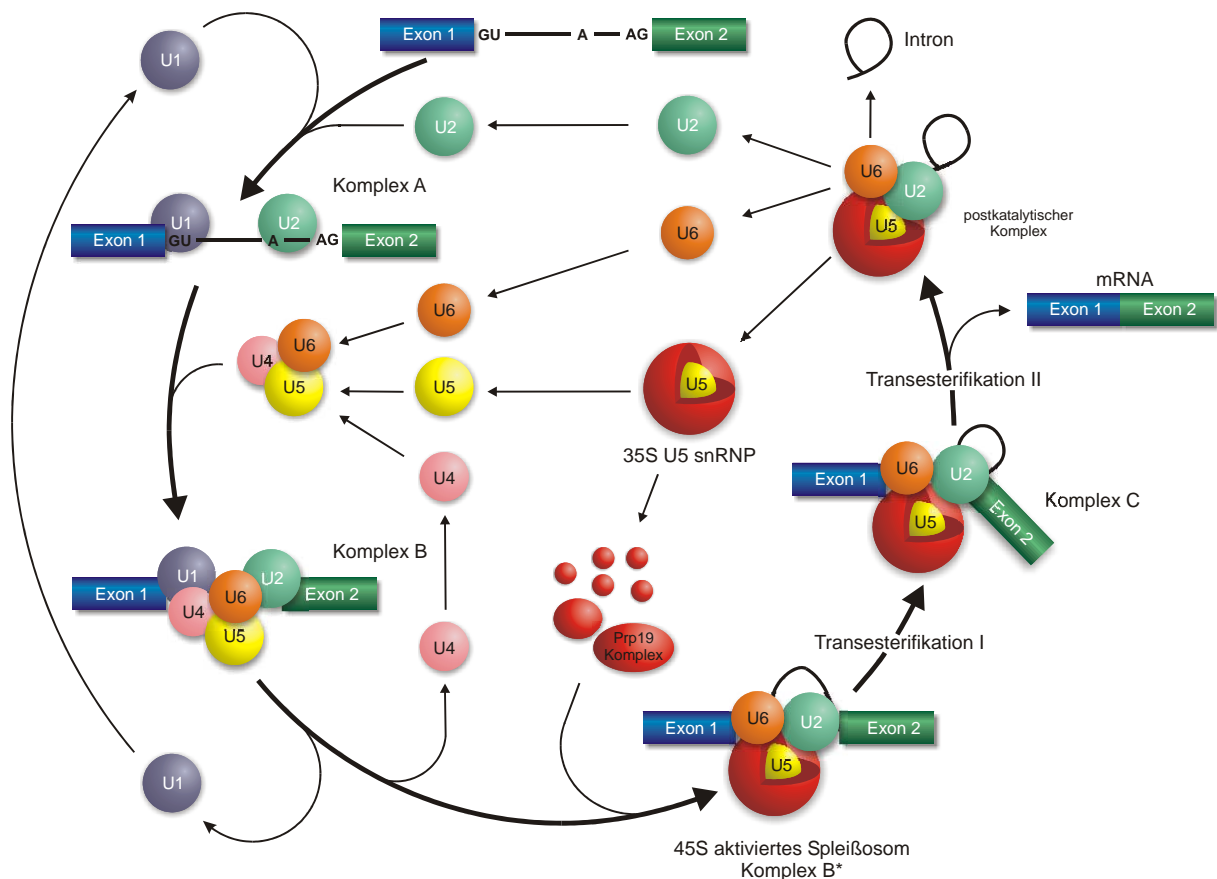
### 2 Einleitung

In den meisten eukaryotischen Genen werden die kodierenden Sequenzen (Exons) von nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen. Das Entfernen der Introns aus der prä-mRNA und das Zusammenfügen der Exons zur mRNA wird als prä-mRNA Spleißen bezeichnet. Dieser Prozess stellt einen wichtigen Schritt in der eukaryotischen Genexpression dar. Das prä-mRNA Spleißen erfolgt im Spleißosom, einem großen Ribonukleoprotein-Komplex, der sich aus fünf U-snRNPs (U1, U2, U4, U5 und U6), bestehend aus einem snRNA Molekül (small nuclear RNA) mit spezifischen Proteinen, und zahlreichen weniger stabil gebundenen non-snRNP Proteinen zusammensetzt [Sharp, 1994; Kuhn und Käufer, 2002; Kuhn und Käufer, 2003]. Das Spleißosom ist ein hochdynamischer Komplex. Im Verlauf der Erkennung und Entfernung der Introns aus der prä-mRNA, durchlaufen die Protein- und RNA-Komponenten des Spleißosoms zahlreiche Veränderungen in der Zusammensetzung und den Interaktionen untereinander.

Die chemischen Reaktionen, die zur Entfernung eines Introns aus der prä-mRNA führen, sowie die Grundkomponenten einschließlich der fünf U-snRNPs eines Spleißosoms, die den Prozess vermitteln, sind evolutionär konserviert. Ein Intron wird aus der prä-mRNA mit zwei Transesterifikationsreaktionen entfernt, wobei diese Reaktion vermutlich von den snRNAs katalysiert wird [Newman, 2001; Valadkhan und Manley 2001; Sontheimer, 2001]. Es ist aber noch unklar, wie viele und welche der Proteine in diesem Prozess involviert sind, die zu den verschiedenen snRNA Umlagerungen führen, die das Spleißosom zur Katalyse aktivieren [Jurica und Moore, 2003].

Als einfache und genetisch leicht zu handhabende Organismen waren die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* bei der Entschlüsselung dieser komplexen Vorgänge hilfreich. Zum Beispiel haben Untersuchungen mit *S. cerevisiae* mit Hilfe eines *in vitro* Spleißsystems zu einem Modell geführt, in dem ein schrittweiser Aufbau der snRNP Moleküle zu einem prä-katalytischen Spleißosom an der prä-mRNA postuliert wird (Abb. 2.1). Nach diesem Modell bindet das U1 snRNP an die 5' Spleißstelle eines Introns und das U2 snRNP erkennt den sogenannten Verzweigungspunkt kurz vor dem 3' Ende eines Introns. (Komplex A; Abb. 2.1). An diesen Komplex A bindet dann das vorgeformte U4/U6.U5 tri-snRNP Molekül, in dem U4 und U6 immer basengepaart vorliegen und vervollständigt das Spleißosom (Komplex B; Abb. 2.1). Vor der Katalyse durchläuft das Spleißosom

zahlreiche strukturelle Veränderungen der snRNPs und Änderungen in der Zusammensetzung der Proteine. [Burge *et al.*, 1999; Kuhn und Käufer, 2003]. Das U1- und U4-snRNP dissoziieren vom Spleißosom und weitere Proteine werden gebunden, die den Übergang vom inaktiven- zum aktiven Spleißosom vermitteln [Abb. 2.1; Staley und Guthrie, 1998; Makarova *et al.*, 2004; Tarn *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2005]. Das aktivierte Spleißosom (Komplex B<sup>\*</sup>; Abb. 2.1) katalysiert in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifikationsreaktionen die Entfernung des Introns und die Verbindung der beiden Exons. Nach der Spleißreaktion wird die mRNA und das Intron in Lariatform von dem post-katalytischen Komplex, der aus den snRNPs U2/U6.U5 besteht, freigesetzt und die snRNPs werden *in vitro* für einen neuen Spleißzyklus verwendet [Mayes *et al.*, 2000; Brow, 2002].



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Spleißzyklus (verändert nach [Burge *et al.*, 1999]). Erläuterungen siehe Text.

Die Entwicklung eines *in vitro* Spleißsystems mit Extrakten aus *S. pombe* war bis heute nicht erfolgreich. Es wurde festgestellt, dass ein solcher Extrakt nur sehr geringe Mengen U4/U6.U5 tri-snRNP Moleküle enthält, aber eine hohe Konzentration

an U2/U6.U5-Partikel. Diese snRNP-Partikel zerfallen bei Zugabe von ATP. Das dabei freigesetzte U2 snRNP bindet an den sogenannten Verzweigungspunkt am 3' Ende des Introns. Der daraus resultierende Komplex ist vergleichbar mit dem Komplex A (Abb. 2.1). Obwohl *in vitro* der Aufbau des Spleißosoms von *S. pombe* bis zum Komplex A erfolgt, wird keine Anlagerung eines U4/U6.U5 tri-snRNP Moleküls an diesen Komplex beobachtet [Huang *et al.*, 2002].

Inzwischen wurde aus einem Extrakt von *S. pombe* ein 40S Komplex aufgereinigt, der aus Cdc5p und weiteren 26 Spleißfaktoren einschließlich der drei snRNAs U2, U5 und U6 besteht [McDonald *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002]. Aufgrund der Protein- und snRNA-Zusammensetzung entspricht dieser Cdc5p-Komplex sehr wahrscheinlich (post)-katalytischen Komplexen, wie in Abbildung 2.1 dargestellt. Es wurden zwei weitere snRNP-Komplexe isoliert, die in relativ großen Mengen im Extrakt vorliegen. Zum einen wurde ein 50S Komplex identifiziert, der mit Hilfe des Spleißfaktors Prp1p aufgereinigt wurde. Obwohl in dieser Arbeit der Arbeitsgruppe Gould [Carnahan *et al.*, 2005] nicht gezeigt wurde, dass dieser Komplex snRNA Moleküle enthält, lässt die durch Proteom-Analyse ermittelte Proteinzusammensetzung darauf schließen, dass es sich um einen Komplex handelt, der mit großer Wahrscheinlichkeit die vier snRNAs U2, U5 und basengepaartes U4/U6 enthält. In diesem Komplex wurde unter anderem auch Prp31p gefunden, aber es wurden keine Proteine identifiziert, die darauf schließen lassen, dass in diesen Komplexen auch snRNA U1 zu finden ist. Zum anderen wurde bei der Aufreinigung von U1-70K ein Komplex gefunden, der wie der Cdc5p-Komplex bei 40S sedimentiert. Dieser Komplex enthält erstaunlicherweise nur snRNA U1, die drei U1 spezifischen Proteine (U1-70K, U1-A, U1-C), die sieben Sm core Proteine und 6 weitere Proteine [Newo Soufo und Käufer, persönliche Mitteilung].

Auch aus einem *S. cerevisiae* Extrakt wurden U-snRNP Komplexe isoliert und analysiert. Dabei wurde ein nahezu identischer Cdc5p-Komplex gefunden [Ohi *et al.*, 2002]. Ein weiterer hochmolekularer Komplex wurde aus zellfreiem Extrakt isoliert. Dieser 45S Komplex enthält die 5 snRNAs U1, U2, U5 und U4/U6, und 85% aller spleißosomalen Proteine. Die Analyse dieses sogenannten penta-snRNPs führte zu der Hypothese, dass die spleißosomalen snRNPs *in vivo* nicht schrittweise an die prä-mRNA gebunden werden, sondern, dass ein zusammengebautes prä-katalytisches Spleißosom (penta-snRNP) die Introns erkennt [Stevens *et al.*, 2002].

Es gibt auch Hinweise, dass prä-katalytische Spleißosomen in Säugerzellen existieren [Malca *et al.*, 2003].

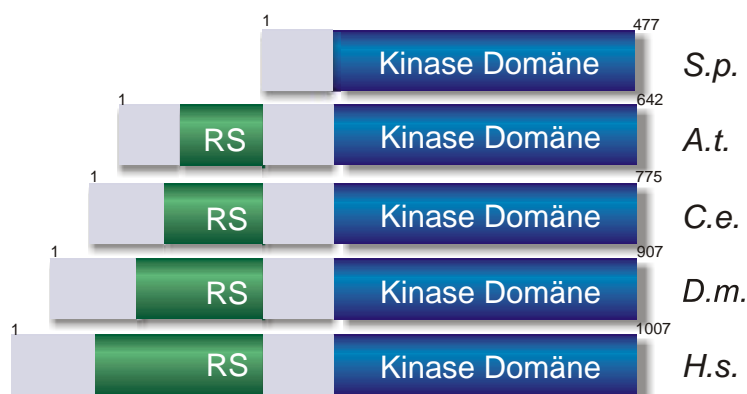
Die Frage, ob Spleißosomen *in vivo* unabhängig von der prä-mRNA zusammengebaut werden, oder ob spleißosomale Komponenten, wie *in vitro*, schrittweise an die prä-mRNA angelagert werden, konnte bisher nicht eindeutig beantwortet werden. Es gibt aber Hinweise, dass in *S. cerevisiae* das U1 snRNP Molekül *in vivo* Introns zuerst kontaktiert [Görnemann *et al.*, 2005; Lacadie und Rosbash, 2005]. In diesem Zusammenhang gibt es noch viele weitere Fragen, die noch nicht beantwortet werden können [Nilsen, 2005]. Insbesondere kann bisher bei der Frage, wie ein prä-katalytisches Spleißosom aktiviert wird nur spekuliert werden. Die beiden U5 spezifischen Proteine Brr2p und Prp8p spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung eines Spleißosoms. Prp8p hat eine zentrale Position im katalytischen Zentrum des Spleißosoms und interagiert direkt mit der ATP abhängigen RNA-Helikase Brr2p [van Nues und Beggs, 2001], die die U4/U6 Duplex *in vitro* aufwinden kann [Raghunathan und Guthrie 1998; Lagerbauer *et al.*, 1998]. Es wird vermutet, dass Prp8p das Aufwinden von U4/U6 durch Brr2p solange verhindert bis alle Faktoren gebunden haben, die zum Spleißen notwendig sind [Grainger und Beggs, 2005]. Aber wie wird kontrolliert, dass alle Faktoren gebunden haben und wie wird ein Spleißosom aktiviert?

Ein Mechanismus für die Regulation und Kontrolle zellulärer Prozesse ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen.

Die erste, direkt am prä-mRNA Spleißen beteiligte Proteinkinase wurde in *S. pombe* gefunden. In einem Pool von temperatursensitiven (ts) *prp*-Mutanten (pre-mRNA-processing), deren molekularer Phänotyp die Akkumulation von prä-mRNA bei der restriktiven Temperatur (36°C) ist, wurde das *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel identifiziert [Rosenberg *et al.*, 1991]. Das *prp4<sup>+</sup>* Gen kodiert ein 55 kD Protein mit der Signatursequenz, einer Serin/Threonin-Proteinkinase [Alahari *et al.*, 1993]. Serin/Threonin-Proteinkinasen werden mit den Tyrosin-Proteinkinasen zur Superfamilie der Proteinkinasen zusammengefasst. Kinasen dieser Superfamilie besitzen eine Kinasedomäne von ca. 250-300 Aminosäuren [Hanks 2003; Hanks und Hunter, 1995].

Auch in anderen Organismen wurden Prp4p Homologe gefunden [Kojima *et al.*, 2001; Dellaire *et al.*, 2002]. Nur in den Hemiascomyceten, zu denen *S. cerevisiae* gehört, gibt es mit Ausnahme von *Yarrowia lipolytica*, keine Kinase mit signifikanter Ähnlichkeit [<http://cbi.labri.fr/Genolevures>]. Die Kinasedomänen der Prp4p-Kinasen

sind hochkonserviert. Die Kinasedomäne von Säugetieren und *S. pombe* besitzen zum Beispiel 53% identische Aminosäuren [Groß *et al.*, 1997]. Außerhalb der Kinasedomäne, im N-Terminus, unterscheiden sich die Prp4p-Kinasen der verschiedenen Organismen [Abb. 2.2; Kuhn und Käufer, 2003]. Der N-terminale Bereich der Prp4p-Kinase von *S. pombe* umfasst 165 Aminosäuren und weist keine Ähnlichkeit zu bekannten Motiven auf. In allen anderen Organismen ist der N-Terminus deutlich länger und enthält RS-Domänen. RS-Domänen bestehen aus einfachen Arginin/Serin-Dipeptiden, die sich wiederholen. Sie können auch von anderen Aminosäuren unterbrochen sein [Manley und Tacke, 1996].



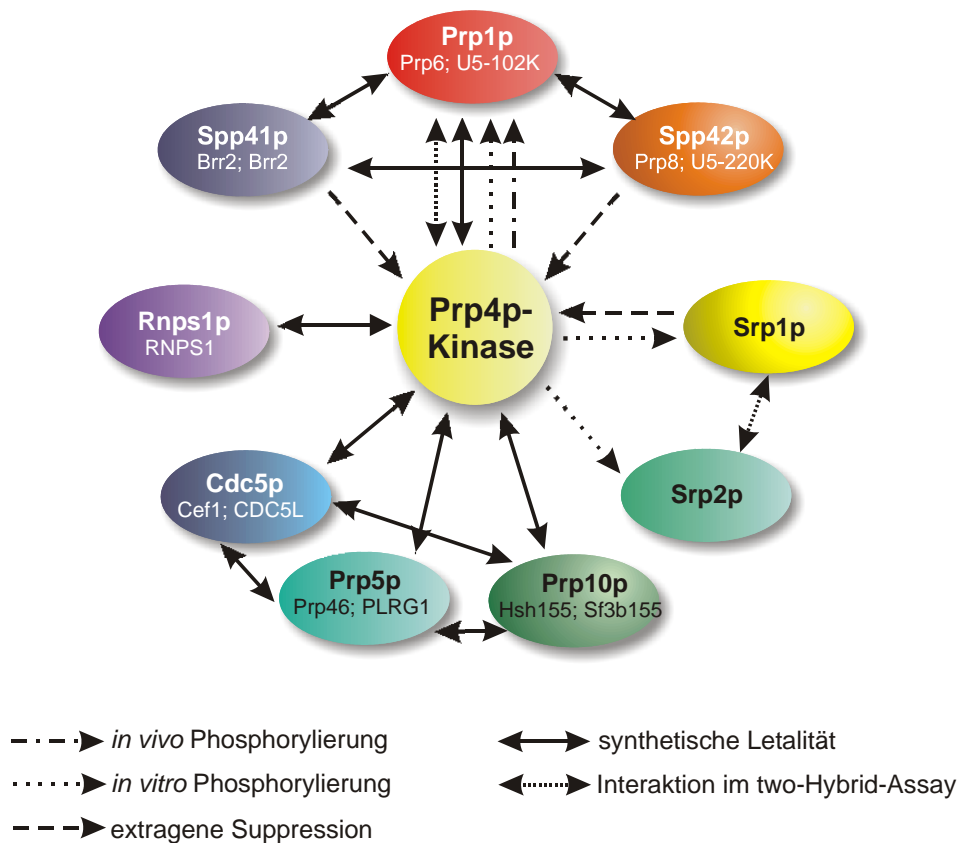
**Abb. 2.2** Schematische Darstellung der Prp4p-Kinasen aus *S. pombe* (*S. p.*), *Arabidopsis thaliana* (*A. t.*), *Caenorhabditis elegans* (*C. e.*), *Drosophila melanogaster* (*D. m.*) und *Homo sapiens* (*H. s.*). RS; Arginin/Serin reiche Domäne. Die Zahlen oberhalb der Rechtecke geben die Positionen der Aminosäuren an [Kuhn und Käufer, 2003].

Um die Funktion der Prp4p-Kinase aufzuklären, wurde zuerst nach genetischen Interaktionen mit dem *prp4-73<sup>ts</sup>*-Allel gesucht. Eine Übersicht der bisher bekannten intermolekularen Interaktionen der Prp4p-Kinase findet sich in Abbildung 2.3.

Es wurden zwei extragene Suppressoren des *prp4-73<sup>ts</sup>*-Alles isoliert und charakterisiert. *spp41<sup>+</sup>* kodiert für Brr2p, die ATP-abhängige RNA-Helikase, die die U4/U6-Duplex aufwindet. *spp42<sup>+</sup>* kodiert für Prp8p, ein 280 kD Protein, das eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des Spleißosoms spielt [Schmidt *et al.*, 1999; Bottner *et al.*, 2005; Grainger und Beggs, 2005].

In einem weiteren genetischen Ansatz wurde nach synthetisch letaler Interaktion mit *prp4-73<sup>ts</sup>* gesucht. Das bedeutet, dass Mutantenallele, die mit *prp4-73<sup>ts</sup>* im gleichen genetischen Hintergrund vorliegen einen Wachstumsstopp verursachen [Urushiyama *et al.*, 1996]. Damit wurde zum Beispiel eine synthetisch letale Interaktion aller

temperatursensitiven Allele von *prp1* mit *prp4-73<sup>ts</sup>* gefunden [Urushiyama *et al.*, 1997; Richert, 2002]. Diese Interaktion zwischen Prp1p und der Prp4p-Kinase wurde mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden ausführlich analysiert. Dabei zeigte sich, dass Prp1p ein physiologisches Substrat der Prp4p-Kinase ist, was darauf schließen lässt, dass die Phosphorylierung von Prp1p eine regulatorische Rolle im Spleißprozess spielt [Schwelnus *et al.*, 2001]. Diese regulatorische Funktion scheint evolutionär konserviert zu sein, da inzwischen auch gezeigt wurde, dass PRP4K aus *Homo sapiens* U5-102K phosphoryliert [Dellaire *et al.*, 2002]. Die Primärsequenz von U5-102K ist mit etwa 50% identischen Aminosäuren ein stark konserviertes Homolog von Prp1p.



**Abb. 2.3** Zusammenfassung der intermolekularen Interaktionen der Prp4p-Kinase in *S. pombe*. Sofern die Homologen Proteine von *S. cerevisiae* und *H. sapiens* bekannt sind, wurden sie zusätzlich angegeben [Kuhn und Käufer, 2003].

Prp1p hat ein Molekulargewicht von 102kD und besitzt am C-Terminus 19 TPR (tetratricopeptide repeat) Motive (Abschnitt 7.2), die vermutlich der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen dienen [Urushiyama *et al.*, 1997; Blatch und Lässle 1999; Lamb *et al.*, 1995]. Allerdings werden durch die Verbesserung der Analyse-

programme mittlerweile auch andere Motive gefunden, wobei dann der C-Terminus aus einer Kombination von TPR und sogenannten HAT (half a TPR) Motiven besteht. HAT Motive sind TPR Motiven strukturell und in der Sequenz sehr ähnlich [Preker und Keller, 1998]. Das kanonische TPR Motiv besteht aus 34 Aminosäuren, mit 8 Aminosäuren, deren Hydrophobizität und Abstand innerhalb des Motivs hoch konserviert ist.

Außerhalb der TPR Motive im N-Terminus von Prp1p finden sich keine Aminosäurefolgen, die auf bisher bekannte Motive schließen lassen. Ein Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs von Prp1p (*S. p.*) mit U5-102K (*H. s.*) und Prp6p (*S. c.*) ergab eine signifikant geringere Homologie (39% identische Aminosäuren zwischen *S. p.* und *H. s.*) als der Vergleich des C-terminalen Bereichs, wo die Sequenzen von *S. pombe* und *H. sapiens* über 50% identische Aminosäuren aufweisen. Die N-terminalen Bereiche bestehen auch aus einer unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren, wodurch im unmittelbaren Vergleich Lücken auftreten. Es gibt nur zwei Bereiche am Anfang und Ende des N-Terminus, wo mehr als 10 Aminosäuren in Folge identisch sind. Auch hier weist *S. cerevisiae* die am stärksten divergierende Sequenz auf (Abb. 2.4).

	26	29,30		232	236	244
<i>S. p.</i>	PPPNYVAGLGRGATGFTTTRSDLGPAQEL		LAQASSNLTSPTIDPKGYLTSLNSMVPKN			
<i>H. s.</i>	APLGYPVGLGRGATGFTTTRSDIGPARDA		LSQVSDSVSGQTVVDPKGYLTDLNSMIPTH			
<i>A. t.</i>	PPSNYVAGLGRGATGFTTTRSDIGPARAA		LDNLSDSVSGQTVVDPKGYLTDLKSMKRTT			
<i>C. e.</i>	APTGYVPGVGRGATGFTTTRSDIGPAPDP		LTQVSTSVTGQTVVDPKGYLTDMQSIIPQM			
<i>D. m.</i>	APLGYPVAGVGRGATGFTTTRSDIGPARDA		LSQVSDSVTGQTVVDPKGYLTDLQSMIPTY			
<i>S. c.</i>	PPAGYVPGIGRGATGFTSTKE-----		LAQLTKNASNP IQV NKPNAATDALS YLKDL			

**Abb. 2.4** Zwei Peptid-Fragmente aus dem N-Terminus von *S. pombe* Prp1p (*S. p.*, acc. no. Q12381) und Vergleich der Sequenzen in den Homologen aus *H. sapiens* (*H. s.*, acc. no. O94906), *Arabidopsis thaliana* (*A. t.*, acc. no. Q9ZT71), *Caenorhabditis elegans* (*C. e.*, acc. no. Q9GRZ2) *Drosophila melanogaster* (*D. m.*, acc. no. Q9VVU6) und *S. cerevisiae* (*S. c.*, acc. no. P19735). Threonin-Reste wurden hervorgehoben, die Zahlen geben die Position in Prp1p von *S. pombe* an.

Biochemische Untersuchungen mit U5-102K (Prp1p) aus *H. sapiens* führten zu dem Ergebnis, dass das Protein eine hohe Affinität zu snRNP U5 aufweist [Makarov *et al.*, 2000], während der Spleißfaktor Prp31p (U4/U6-61K) eine hohe Affinität zu dem basengepaarten Molekül U4/U6 zeigt [Makarova *et al.*, 2002]. Für beide Proteine wurde eine direkte Interaktion im tri-snRNP U4/U6.U5 nachgewiesen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vorgeschlagen, dass beide Proteine bei der Formation eines U4/U6.U5 tri-snRNPs eine wichtige Rolle spielen [Makarova *et al.*, 2002].



## 3 Ergebnisse

### 3.1. Nachweis spleißosomaler Komplexe in Zellextrakt

Zum immunologischen Nachweis von Prp1p, Prp4p und anderen spleißosomalen Proteinen wurden die entsprechenden Wildtyp Allele mit einem Epitop fusioniert und über homologe Rekombination in das Genom integriert. So wurde z. B. das *prp1<sup>+</sup>* Allel mit einem N-terminalen Myc-Epitop (humanes p62-c-Myc Peptid) fusioniert. Zellen dieses Stammes exprimieren ein funktionelles Myc-Prp1p Fusionsprotein (Tab. 3.1). Sie weisen die gleiche Wachstumsrate und Morphologie wie der Wildtyp auf.

In drei weiteren Stämmen wurde das endogene *prp4<sup>+</sup>*, *prp31<sup>+</sup>* und *cdc5<sup>+</sup>* Allel mit einem HA-Epitop (Influenza Hemagglutinin Peptid) fusioniert (Tab. 3.1).

Um untersuchen zu können, ob Prp1p in Komplexen mit Prp31p und Cdc5p vorliegt, wurde in den *Myc-prp1<sup>+</sup>* Stamm das *HA-cdc5<sup>+</sup>*-Allel oder das *HA-prp31<sup>+</sup>* Allel eingekreuzt (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1** *S. pombe* Stämme, die Prp1p als Fusionsprotein mit dem Myc-Epitop bzw. Prp4p, Prp31p und Cdc5p als HA-Fusionsproteine exprimieren.

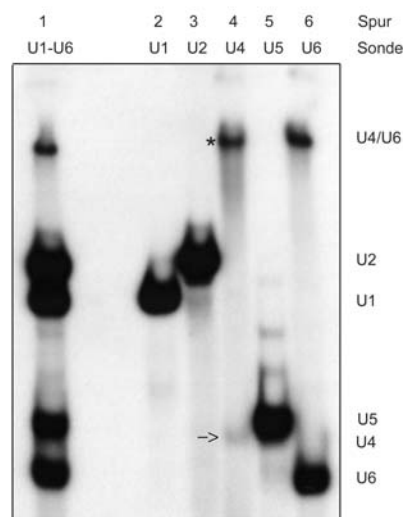
Stamm	Genotyp
288	<i>h<sup>S</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> leu1-32 ura4-294</i>
337	<i>h<sup>S</sup> HA-prp4<sup>+</sup> leu1-32 ura4-294</i>
380	<i>h<sup>S</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-cdc5<sup>+</sup></i>
407	<i>h<sup>S</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> prp4-73<sup>ts</sup> leu1-32 ura4-D18</i>
AK030	<i>h<sup>N</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup></i>
AK042	<i>h<sup>N</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-D18 ade6-M210</i>
KGY792	<i>h<sup>N</sup> HA-cdc5<sup>+</sup></i>

Die Fusionsproteine wurden mit dem entsprechenden Antikörper immunpräzipitiert, und aus den Immunpräzipitaten wurde RNA isoliert, um die U-snRNAs zu bestimmen. Dazu wurde eine Technik verwendet, die „Solution Hybridisation“ genannt wird [Li *et al.*, 1993]. Es werden 5' [<sup>32</sup>P] markierte Oligonukleotide, die komplementär zur U1-, U2-, U4-, U5- und U6 snRNA sind mit der isolierten RNA in Lösung (**Solution**) inkubiert. Nach Hybridisierung (**Hybridisation**) wird das RNA-Hybrid in einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie

sichtbar gemacht. Die Methode ermöglicht den Nachweis von basengepaarten U4/U6 snRNA Molekülen (Abb. 3.1). Spleißosomale Partikel, die basengepaarte U4/U6 und weitere snRNAs enthalten, sind ein Indiz für prä-katalytische Komplexe. Die Basenpaarung zwischen U4/U6 wird bei der Aktivierung zum katalytischen Spleißosom gelöst und die U6 snRNA geht Basenpaarungen mit der U2 snRNA ein. Das bedeutet, dass spleißosomale Partikel, die aus U2-, U5- und U6 snRNA bestehen als (post-) katalytische Komplexe bezeichnet werden können.

#### 3.1.1 In wachsenden Zellen finden sich nur wenig freie U4 snRNPs

Um die Technik der Solution Hybridisation für die fünf spleißosomalen snRNA Sonden zu standardisieren, wurde RNA aus logarithmisch wachsenden Zellen isoliert und gleiche Mengen der RNA in fünf Ansätzen jeweils mit dem entsprechenden 5' markierten, komplementären Oligonukleotid als Sonde hybridisiert. In einem weiteren Ansatz wurden alle fünf Sonden in die Hybridisierungslösung gegeben. Nach der Hybridisierung wurden die verschiedenen Ansätze auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und dann autoradiographisch dargestellt (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1** U-snRNA Nachweis in *S. pombe* Gesamtextrakt mit Hilfe des Solution Hybridisation Assay. Gesamt-RNA aus Wildtypzellen wurde isoliert und mit  $^{32}\text{P}$ -markierten U-snRNA Oligonukleotidsonden inkubiert. In einem Ansatz wurden alle fünf Sonden in die Hybridisierungslösung gegeben (Spur 1; U1-U6). In fünf weiteren Ansätzen wurde jeweils nur eine Sonde eingesetzt. (Spur 2: U1; Spur 3: U2; Spur 4: U4; Spur 5: U5; Spur 6: U6). Die Hybridisierungsansätze wurden im nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Pfeil markiert die, nur in geringen Mengen vorhandene freie U4 snRNA, der Stern die basengepaarte U4/U6 snRNA (Spur 4).

Der Hybridisierungsansatz, der alle fünf Sonden enthält zeigt fünf Banden (Abb. 3.1, Spur 1). Mit Hilfe der Hybridisierungsansätze die nur jeweils eine der fünf Sonden enthalten, lassen sich die Positionen von U1, U2, U5 und U6 im Gel eindeutig bestimmen (Abb. 3.1; Spur 2, 3, 5, 6). Die Sonde für U6 hybridisiert mit zwei snRNA Molekülen unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit (Abb. 3.1; Spur 6), wobei die Position eines der Moleküle im Gel übereinstimmt mit dem snRNA Molekül, das auch die Sonde für U4 erkennt (Abb. 3.1; Spur 4, Stern). Aus dieser Beobachtung kann man schließen, dass dieses snRNA Molekül das basengepaarte U4/U6 Molekül repräsentiert, und dass in logarithmisch wachsenden Zellen fast alle U4 Moleküle basengepaart mit U6 vorliegen (Abb. 3.1; Spur 4, Pfeil).

#### **3.1.2 Prp1p ist mit U-snRNAs assoziiert, die Prp4p-Kinase nicht**

Als nächstes wurde untersucht, ob Prp1p und Prp4p in Zellextrakt mit snRNP Komplexen assoziiert sind. Dazu sollten Prp1p und Prp4p aus Gesamtextrakt immunpräzipitiert werden und anschließend auf die Anwesenheit von U-snRNA untersucht werden.

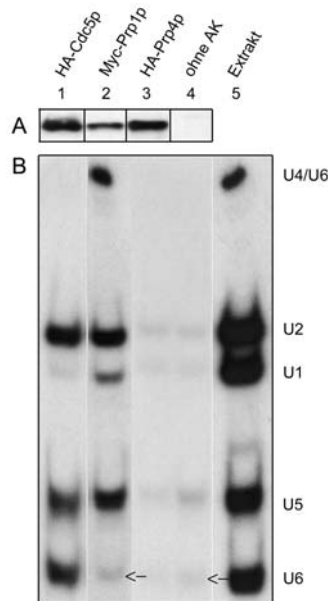
Zur Etablierung der Methodik wurde das Protokoll zum Nachweis des Cdc5p-Komplexes durchgeführt. Dieser Komplex enthält die U2-, U5- und U6 snRNAs, Cdc5p und 26 weitere spleißosomale Proteine. Weder Prp1p noch Prp4p liegen in diesem Komplex vor [McDonald *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002].

Gesamtextrakt von HA-Cdc5p exprimierenden Zellen, wurde immunpräzipitiert. HA-Cdc5p wurde mittels Western-Analyse im Immunpräzipitat nachgewiesen (Abb. 3.2 A; Spur 1). Aus einem Aliquot des Immunpräzipitats wurde RNA isoliert und mit Hilfe der Solution Hybridisation Technik wurde der Gehalt der U-snRNAs bestimmt. Das Immunpräzipitat enthält die snRNAs U2, U5 und U6, wobei die Signale der drei snRNA Moleküle ungefähr gleich stark sind (Abb. 3.2 B; Spur 1).

In gleicher Weise wurden Immunpräzipitate von Myc-Prp1p und HA-Prp4p untersucht. Im Immunpräzipitat von Myc-Prp1p (Abb. 3.2 A; Spur 2) werden die snRNAs U2, U1, U5 und U4/U6 nachgewiesen (Abb. 3.2 B; Spur 2). Vergleicht man die Intensitäten der Signale von den snRNA Molekülen im Gel, wird deutlich, dass die Signale für die snRNAs U2, U5 und U4/U6 in etwa gleich stark sind, während das Signal für die snRNA U1 deutlich schwächer ist (Abb. 3.2 B; Spur 2). Für snRNA U6 wird ein schwaches Signal erhalten (Abb. 3.2 Spur 2 Pfeil). Die Intensität des Signals ist mit dem Signal in der Kontrollpräzipitation vergleichbar (Abb. 3.2 Spur 4 Pfeil).

D.h., U6 snRNA koprizipitiert nicht mit Myc-Prp1p. Mit dieser Analyse kann noch nicht geklärt werden, ob Prp1p *in vivo* mit spleißosomalen Komplexen und/oder mit individuellen U-snRNA Molekülen assoziiert ist.

Die Prp4p-Kinase wurde aus Gesamtextrakt von Zellen des Stammes 337 ( $h^S$  HA-*prp4*<sup>+</sup> *leu1-32* *ura4-294*; Tab. 3.1) immunpräzipitiert (Abb. 3.2 A; Spur 3). Im Immunpräzipitat von HA-Prp4p werden keine snRNAs nachgewiesen (Abb. 3.2 B; Spur 3). Daraus kann man schließen, dass die Prp4p-Kinase in *S. pombe* nicht stabil mit U-snRNPs assoziiert ist.

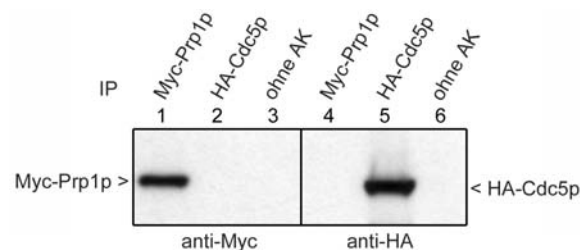


**Abb. 3.2** Prp1p und Cdc5p sind stabil mit U-snRNA assoziiert, die Prp4p-Kinase nicht. **(A)** Myc-Prp1p, HA-Prp4p oder HA-Cdc5p wurde mit anti-HA Antikörper (Spur 1, 3) bzw. anti-Myc Antikörper (Spur 2) aus Gesamtextrakt immunpräzipitiert und die Proteine mittels Westen-Analyse nachgewiesen. Ohne AK, Kontrollpräzipitation ohne Antikörper. **(B)** Aus den Immunpräzipitaten (Spur 1-4) wurde die RNA isoliert und in den Solution Hybridisation Assay mit den 5' [<sup>32</sup>P] markierten U-snRNA Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Pfeile weisen darauf hin, dass die Signalstärke für snRNA U6 im Myc-Prp1p Immunpräzipitat (Spur 2) und im Kontrollpräzipitat (Spur 4) vergleichbar ist. Die Position der individuellen snRNAs wurde nach Hybridisierung der aus Gesamtextrakt isolierten RNA mit den U-snRNA spezifischen Sonden erhalten (Extrakt; Spur 5).

### 3.1.3 Prp1p und Cdc5p liegen nicht in dem gleichen Komplex vor

Prp1p ist kein Bestandteil des 40S Cdc5p-Komplexes, was jedoch nicht ausschließt, dass Prp1p und Cdc5p gemeinsam in anderen Komplexen vorliegen [McDonald *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002].

Um zu untersuchen, ob Cdc5p mit Prp1p in einem Komplex vorliegt, wurde der Stamm 380 ( $h^{-S}$  *Myc-prp1<sup>+</sup> HA-cdc5<sup>+</sup>*; Tab. 3.1) verwendet. In zwei Ansätzen wurde Myc-Prp1p und HA-Cdc5p aus Gesamtextrakt dieser Zellen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und entweder mit Myc- oder mit HA- Antikörpern inkubiert. Im Immunpräzipitat von HA-Cdc5p (Abb. 3.3; Spur 5) wurde mit dieser Western-Analyse kein Myc-Prp1p nachgewiesen (Abb. 3.3; Spur 2). Auch HA-Cdc5p wird nicht mit Myc-Prp1p kopräzipitiert (Abb. 3.3; Spur 1, 4). Dieser Versuch zeigt, dass Prp1p und Cdc5p nicht in einem gemeinsamen Komplex vorliegen.



**Abb. 3.3** Prp1p und Cdc5p liegen nicht im gleichen Komplex vor. Mit den entsprechenden Antikörpern wurde Myc-Prp1p (Spur 1, 4) und HA-Cdc5p (Spur 2, 5) aus Gesamtextrakt immunpräzipitiert (IP). Die Immunpräzipitate wurden in einer Western-Analyse auf Myc-Prp1p (Spur 1-3) und HA-Cdc5p (Spur 4-6) untersucht. Weder (ko)-präzipitiert Myc-Prp1p mit HA-Cdc5p (Spur 2) noch (ko)-präzipitiert HA-Cdc5p mit Myc-Prp1p (Spur 4). Ohne AK (Spur 3, 6); Kontrollpräzipitation ohne Antikörper.

### 3.1.4 Prp1p und Prp31p assoziieren mit den gleichen snRNAs

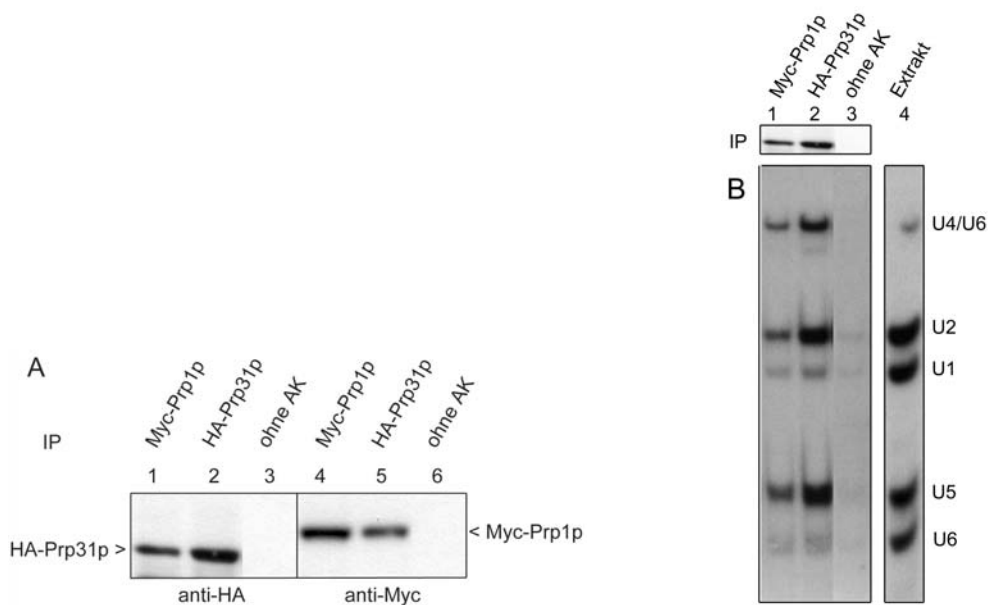
Biochemische Analysen mit U5-102K (Prp1p) und U4/U6-61K (Prp31p) aus *H. sapiens* ergaben, dass beide Proteine im tri-snRNP U4/U6.U5 direkt miteinander interagieren [Makarova *et al.*, 2002]. Mit Hilfe von Immunpräzipitationen sollte untersucht werden, ob Prp1p und Prp31p auch in *S. pombe* in einem spleißosomalen Komplex vorliegen.

Myc-Prp1p und HA-Prp31p wurden aus Gesamtextrakt von Zellen des Stammes AK030 ( $h^{+N}$  *Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup>*; Tab. 3.1) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Hilfe einer

Western-Analyse nachgewiesen. Das Immunpräzipitat von Myc-Prp1p (Abb. 3.4 A; Spur 4) zeigte mit anti-HA Antikörpern ein Signal für HA-Prp31p (Abb. 3.4 A; Spur 1). Ebenso wird Myc-Prp1p (Abb. 3.4 A; Spur 5) von HA-Prp31p (Abb. 3.4 A; Spur 2) kopräzipitiert.

Mit der Solution Hybridisation Technik wurde in den Immunpräzipitaten der Gehalt der U-snRNAs bestimmt. In Myc-Prp1p Immunpräzipitaten wurden Signale für die snRNAs U2-, U1-, U5- sowie U4/U6-snRNA erhalten. Wiederum ist das Signal für snRNA U1 im Prp1p Immunpräzipitat schwächer als die Signale für U2-, U5- und U4/U6. Das gleiche snRNA Muster ist auch im Immunpräzipitat von HA-Prp31p zu beobachten (Abb. 3.4 B; Spur 2).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Prp1p und Prp31p in den gleichen spleißosomalen snRNP Komplexen vorliegen.



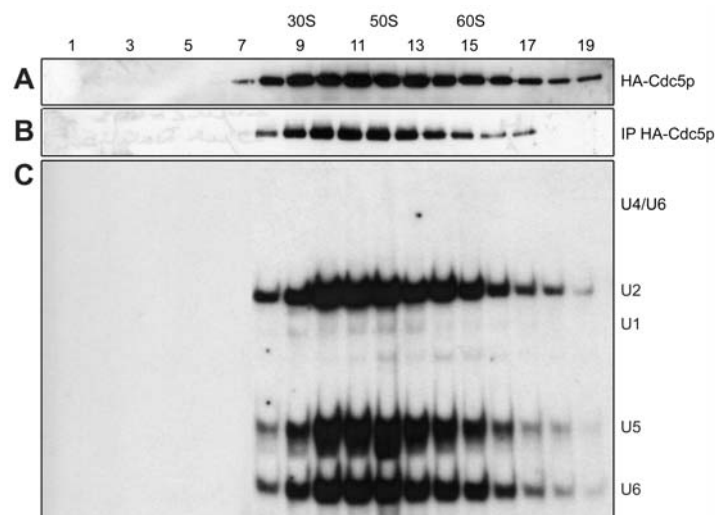
**Abb. 3.4** Prp1p und Prp31p liegen in den gleichen spleißosomalen snRNP Komplexen vor (**A**) Zuerst wurde mit den entsprechenden Antikörpern Myc-Prp1p (Spur 1, 4) und HA-Prp31p (Spur 2, 5) aus Gesamtextrakt immunpräzipitiert (IP) und dann in einer Western-Analyse HA-Prp31p (Spur 1, 2) und Myc-Prp1p (Spur 4, 5) nachgewiesen. HA-Prp31p (ko)-präzipitiert mit Myc-Prp1p (Spur 1) und Myc-Prp1p (ko)-präzipitiert mit HA-Prp31p (Spur 5). Ohne AK (Spur 3, 6); Kontrollpräzipitation ohne Antikörper. (**B**) Solution Hybridisation Assay mit der snRNA aus den Immunpräzipitaten (IP) 1-3 von (A) und aus Gesamtextrakt (Spur 4; Extrakt).

### 3.2 Verteilung von Prp1p und Prp31p im Dichtegradienten

Um zu untersuchen, mit welchen Komplexen Prp1p und Prp31p assoziiert sind, wurde Gesamtextrakt in einem Glyceroldichtegradienten aufgetrennt und die Assoziation von Prp1p und Prp31p mit den U-snRNAs in den Fraktionen bestimmt.

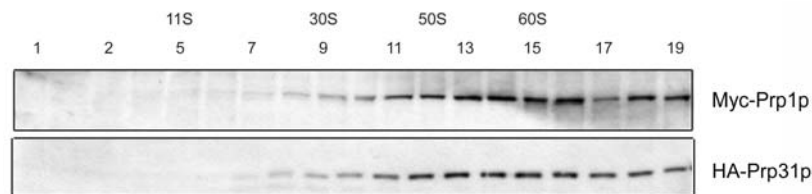
Auch hier wurde der Cdc5p-Komplex zur Etablierung der Methodik benutzt. Dazu wurde Gesamtextrakt in einem 10-30% Glycerolgradienten aufgetrennt und fraktioniert. In den Fraktionen 1-19 wurde mit Hilfe einer Western-Analyse das Verteilungsprofil von HA-Cdc5p im Gradienten bestimmt (Abb. 3.5 A). Anschließend wurde jede Fraktion mit HA-Antikörpern immunpräzipitiert (Abb. 3.5 B) und mit Hilfe der Solution Hybridisation Technik in den Immunpräzipitaten der Gehalt der U-snRNAs bestimmt (Abb. 3.5 C).

Diese Analyse bestätigt, dass der Cdc5p-Komplex im Bereich von 40S sedimentiert und ausschließlich die snRNAs U2, U5 und U6 enthält (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5** Cdc5p assoziiert im 40S Komplex mit U2-, U5-, und U6 snRNA. Gesamtextrakt wurde im 10-30% Glycerolgradienten aufgetrennt und die Fraktionen manuell von oben (1) nach unten (19) gesammelt. **(A)** Ein Aliquot jeder Fraktion wurde im SDS-Gel aufgetrennt und HA-Cdc5p mittels Western-Analyse nachgewiesen. **(B)** Die Fraktion 1-19 wurden mit HA-Antikörpern immunpräzipitiert (IP) und HA-Cdc5p in den Immunpräzipitaten nachgewiesen **(C)** Aus den Immunpräzipitaten wurde die RNA isoliert und im Solution Hybridisation Assay auf das Vorhandensein von U-snRNA untersucht.

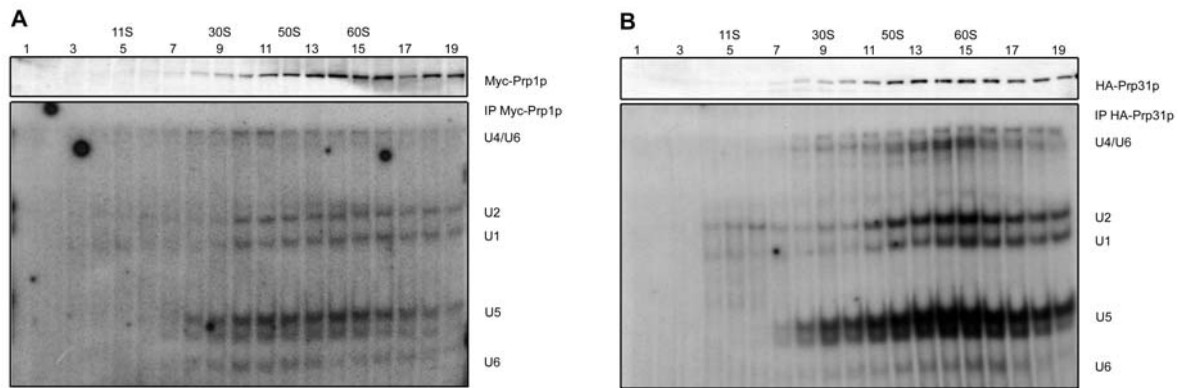
Um die Größe und den snRNA Gehalt der Myc-Prp1/HA-Prp31 Komplexe zu bestimmen, wurde Gesamtextrakt in einem 10-30% Glycerolgradienten aufgetrennt und fraktioniert. Die Fraktionen 1-19 wurden im SDS-Gel aufgetrennt und Myc-Prp1p und HA-Prp31p mit einer Western-Analyse nachgewiesen. Die Gradientenprofile zeigen, dass Myc-Prp1p und HA-Prp31p in einem weiten Bereich zwischen 30S und 80S sedimentieren, wobei zwischen 50 und 60S eine Konzentrierung zu beobachten ist. In Regionen <30S wird weder Prp1p noch Prp31p gefunden (Abb. 3.6; Myc-Prp1p, HA-Prp31p).



**Abb. 3.6** Prp1p und Prp31p sedimentieren in einem weiten Bereich zwischen 30S und 80S. Gesamtextrakt wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt und fraktioniert. Mit einer Western-Analyse wurde die Verteilung von Myc-Prp1p und HA-Prp31p über den Gradienten untersucht.

Um festzustellen, mit welchen snRNP Partikeln Myc-Prp1p und HA-Prp31p in den Gradientenfraktionen assoziiert sind, wurden Aliquots der Fraktionen 1-19 mit Myc- bzw. HA-Antikörpern immunpräzipitiert und RNA aus den Immunpräzipitaten isoliert. Die snRNA Analyse der Gradientenfraktionen zeigt, dass Prp1p und Prp31p in Komplexen >30S mit den snRNAs U1-, U2-, U5- und mit basengepaarter U4/U6 vorliegen (Abb. 3.7 A und B). Insbesondere zeigt das snRNA Profil der HA-Prp31p Präzipitate, dass die Partikel, die im Bereich zwischen 50 und 60S sedimentieren die snRNAs U1, U2, U5 und basengepaartes U4/U6 enthalten. In diesen Fraktionen ist kaum U6 snRNA nachzuweisen (Abb. 3.7 B), was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass Prp1p und Prp31p in der Zelle hauptsächlich mit spleißosomalen Komplexen assoziiert vorliegen, die die snRNAs U1.U2.U5.U4/U6 enthalten. Diese Komplexe sind salzresistent. Zwischen 50 und 500 mM NaCl wurde keine Veränderung im Sedimentationsprofil beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Auf dieser Grundlage können diese spleißosomalen Komplexe als prä-katalytische Komplexe bezeichnet werden.



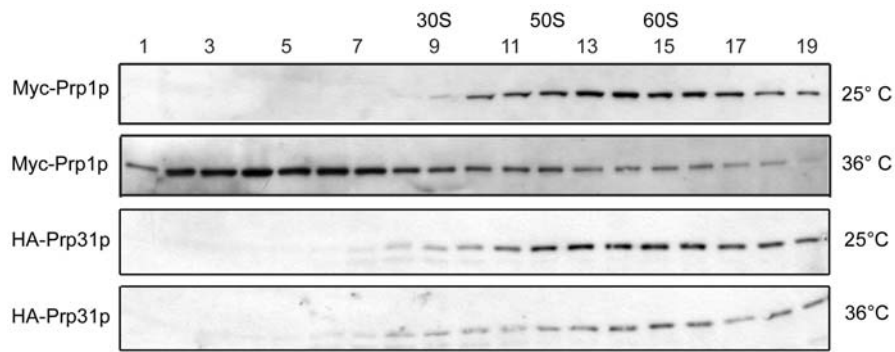


**Abb. 3.7** Prp1p und Prp31p assoziieren mit prä-katalytischen Komplexen. Gesamtextrakt aus Stamm AK030 ( $h^{+N}$  *Myc-prp1*<sup>+</sup> *HA-prp31*<sup>+</sup>) wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt. Mit den Fraktionen 1-19 wurde eine Western-Analyse **(A)** auf Myc-Prp1p und **(B)** HA-Prp31p durchgeführt. Dann wurden die Fraktionen mit Myc- bzw. HA-Antikörpern immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate im Solution Hybridisation Assay auf das Vorhandensein von U-snRNA untersucht (IP Myc-Prp1p, IP HA-Prp31p).

### 3.3 Prp1p akkumuliert bei 36°C im niedrigen S-Bereich

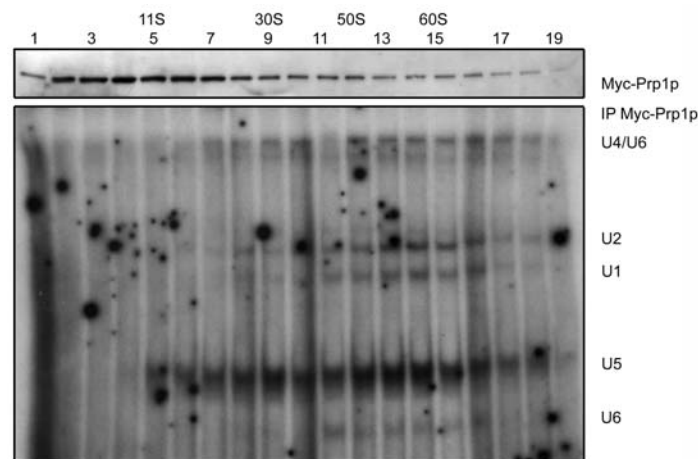
Als nächstes wurde untersucht, ob die Prp4p-Kinaseaktivität einen Einfluss auf die prä-katalytischen Komplexe hat. Für diese Untersuchungen wurde der temperatursensitive *prp4-73<sup>ts</sup>* Stamm verwendet (Stamm 407; Tab. 3.1). Bei 25°C wachsende Kulturen wurden auf 36°C erwärmt und 4 Stunden inkubiert. In dieser Zeit stellen die Zellen bei 36°C das Wachstum ein und akkumulieren prä-mRNA [Schwelnus *et al.*, 2001]. Gesamtzellextrakt wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt und Myc-Prp1p und HA-Prp31p in den Fraktionen 1-19 nachgewiesen.

Unter permissiven (25°C) Bedingungen sedimentieren Myc-Prp1p und HA-Prp31p wie zuvor im Bereich von 30 bis 80S (Abb. 3.8; 25°C). Bei der restriktiven Temperatur (36°C) beobachtet man eine Veränderung des Sedimentationsprofils von Myc-Prp1p. Myc-Prp1p wird in allen Fraktionen des Gradienten nachgewiesen. Es ist sogar eine Akkumulation von Myc-Prp1p in den Fraktionen niedriger Dichte zu beobachten (Abb. 3.8; Myc-Prp1p, 36°C; Spur 2 - 7). Auf das Sedimentationsverhalten von HA-Prp31p hat die Temperaturerhöhung jedoch keinen Einfluss (Abb. 3.8; HA-Prp31p, 36°C).



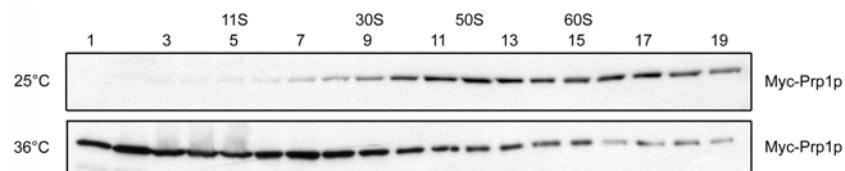
**Abb. 3.8** Prp1p akkumuliert bei 36°C in *prp4-73<sup>ts</sup>* im niedrigen S-Bereich. Gesamtextrakt aus *prp4-73<sup>ts</sup>*, bei 25°C und nach 4 Stunden bei 36°C, wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt. Myc-Prp1p und HA-Prp31p wurden in den Fraktionen mittels Western-Analyse nachgewiesen.

Als nächstes wurde untersucht, ob Myc-Prp1p in allen Fraktionen mit U-snRNA assoziiert ist. Die Fraktionen 1 bis 19 wurden mit Myc-Antikörper immunpräzipitiert und im Präzipitat die U-snRNAs bestimmt. Die Untersuchung der Immunpräzipitate ergab, dass Prp1p in den Fraktionen 1 bis 4 nicht mit snRNA assoziiert ist (Abb. 3.9). Es ist deshalb möglich, dass U-snRNA freies Prp1p in der Zelle akkumuliert, wenn es nicht von der Prp4p-Kinase phosphoryliert wird. In diesem Fall könnte man die Anreicherung von freiem Prp1p als Stabilisierung des Proteins unter Kinase-inaktiven (36°C) Bedingungen interpretieren. Andererseits könnte die Anhäufung von Prp1p auch eine Antwort der Zelle auf die Inkubationstemperatur bei 36°C sein. Um Temperatureffekte auszuschließen, wurde der Versuch mit einem Wildtyp-Stamm wiederholt.



**Abb. 3.9** Prp1p akkumuliert bei 36°C frei von snRNA. Gesamtextrakt aus *prp4-73<sup>ts</sup>*, nach 4 Stunden bei 36°C, wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt und die Fraktionen auf Myc-Prp1p untersucht (Myc-Prp1p). Anschließend wurde Myc-Prp1p aus den Fraktionen immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate auf U-snRNA untersucht (IP Myc-Prp1p).

Wildtyp-Zellen, die Myc-Prp1p exprimieren wurden bei 25°C und 4 Stunden bei 36°C inkubiert. Gesamtextrakt wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt und mit Hilfe einer Western-Analyse das Sedimentationsprofil von Myc-Prp1p bestimmt. Auch Wildtyp-Zellen akkumulieren freies Prp1p nach Inkubation bei 36°C (Abb. 3.10). Deshalb ist die Akkumulation von Prp1p in Kinase-inaktiven Zellen nicht auf das Fehlen der Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p-Kinase zurückzuführen. Es ist deshalb möglich, dass Prp1p Moleküle, die nicht mit prä-katalytischen Spleißosomen assoziieren, im Rahmen des „Heat-Response“ der Zelle von den Hitzeschock Proteinen stabilisiert werden.



**Abb. 3.10** Prp1p akkumuliert bei 36°C im Wildtyp im niedrigen S-Bereich. Gesamtextrakt aus Wildtyp, bei 25°C und nach 4 Stunden bei 36°C, wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt. Myc-Prp1p wurde mittels Western-Analyse in den Fraktionen nachgewiesen.

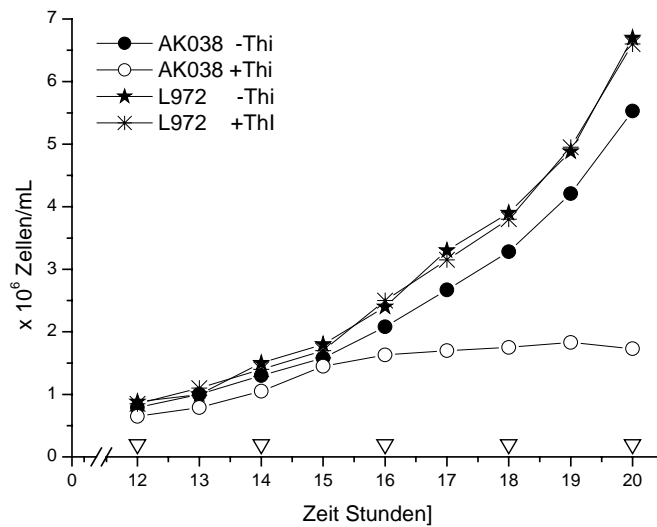
### 3.4 Die Prp4p-Kinaseaktivität hat keinen Einfluss auf die U-snRNA Zusammensetzung der Prp1p/Prp31p Komplexe

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der Prp4p Kinaseaktivität einen unmittelbaren Einfluss auf die spleißosomalen Komplexe hat, die mit Prp1p und Prp31p assoziiert sind, und vor allem, um die „Hitzeschockreaktion“ auf Prp1p in temperatursensitiven Stämmen zu umgehen, wurde ein konditional letaler *prp4* Stamm konstruiert. In diesem Stamm wurde das endogene *prp4*<sup>+</sup> Allel unterbrochen und ein *prp4*<sup>+</sup> Gen in das Genom eingeführt, das von dem reprimierbaren Promotor *nmt81* (no message in thiamine) gesteuert wird (Tab. 3.2). Die Zugabe von Thiamin in das Medium reprimiert den Promotor, was schließlich zu einer Verarmung von Prp4p und damit zu stetig absinkender Kinaseaktivität in der Zelle führt.

**Tab. 3.2** *prp4* konditional letale *S. pombe* Stämme.

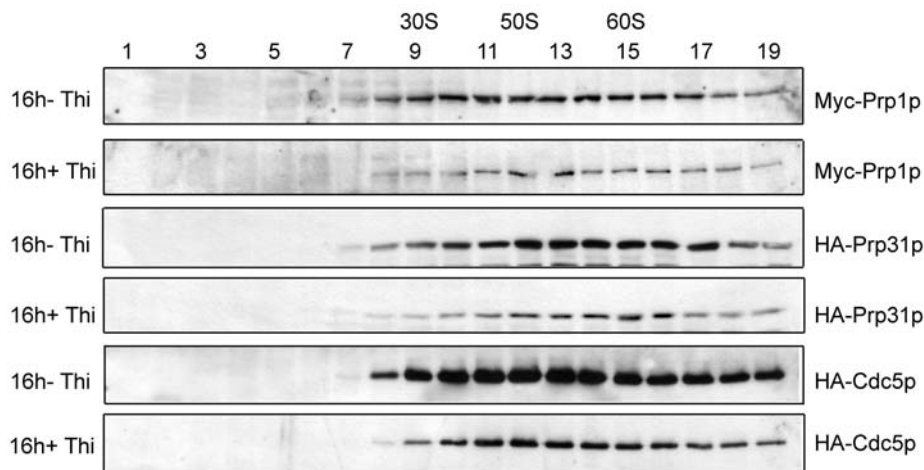
Stamm	Genotyp
AK038	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>N</i> <i>prp4::his7</i> <sup>+</sup> <i>leu1::int nmt81prp4</i> <sup>+</sup> <i>HA-prp31</i> <sup>+</sup>
AK054	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>N</i> <i>prp4::his7</i> <sup>+</sup> <i>leu1::int nmt81prp4</i> <sup>+</sup> <i>Myc-prp1</i> <sup>+</sup> <i>HA-prp31</i> <sup>+</sup>
AK057	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>N</i> <i>prp4::his7</i> <sup>+</sup> <i>leu1::int nmt81prp4</i> <sup>+</sup> <i>Myc-prp1</i> <sup>+</sup> <i>HA-cdc5</i> <sup>+</sup>

Das Wachstumsverhalten dieser Stämme in Medium, dem kein Thiamin (-Thi) zugegeben war, ist mit einem Wildtyp Stamm identisch. Bei 30°C beträgt die Generationszeit 3 Stunden. In Medium, dem Thiamin zugegeben wurde (+Thi), stellt ein konditional letaler *prp4* Stamm nach 16 Stunden das Wachstum ein (Abb. 3.11). Deshalb wurde von Kulturen, die 16 Stunden ohne Thiamin oder 16 Stunden mit Thiamin gewachsen waren, Zellextrakt isoliert, auf einem Glycerolgradienten aufgetrennt und die Verteilung von Prp1p, Prp31p und Cdc5p im Gradienten mit Hilfe von Western-Analysen bestimmt.



**Abb. 3.11** Wachstumsverhalten des konditional letalen *prp4*-Stammes AK038 ( $h^{+N}$  *prp4::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp4<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup>*; Tab. 3.2) bei 30°C in Medium mit (+Thi) und ohne Thiamin (-Thi). L972; Wildtyp. Die Dreiecke markieren die Zeitpunkte, an denen Aliquots der Kulturen zur Bestimmung der Konzentration von Myc-Prp1p, HA-Prp31p, HA-Cdc5p, Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin entnommen wurden (Siehe Abb. 3.13).

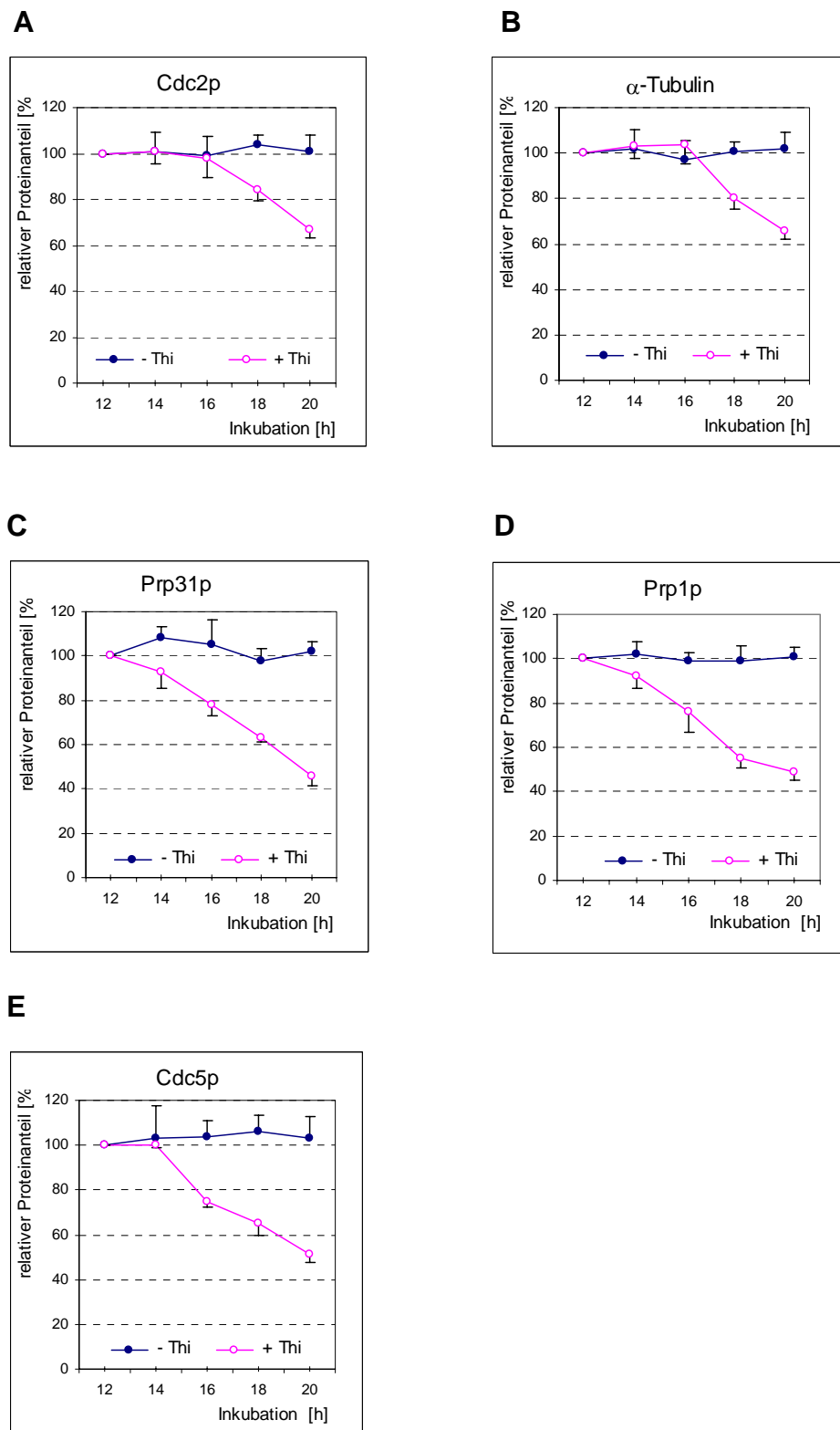
Prp1p und Prp31p zeigen bei beiden Bedingungen (-Thi und +Thi) das gleiche Sedimentationsverhalten wie zuvor. Beide Proteine sedimentieren in dem Bereich von 30-80S. Weder Prp1p noch Prp31p sedimentiert in der Region <30S. Cdc5p sedimentiert bei beiden Bedingungen in der Region von 40S, wobei ebenfalls keine Cdc5p Komplexe <30S oder snRNA freies Cdc5p entdeckt werden (Abb. 3.12). Allerdings scheinen in Zellen, die das Wachstum eingestellt haben (+Thi) im Vergleich zu wachsenden Zellen (-Thi), sowohl die Prp1p/Prp31p Komplexe als auch der Cdc5p Komplex in geringeren Konzentrationen vorzuliegen (Abb. 3.12). Deshalb sollte zunächst festgestellt werden, ob die Konzentration der spleißosomalen Proteine Prp1p, Prp31p und Cdc5p in Abhängigkeit von der Zeit in Medium mit Thiamin abnimmt.



**Abb. 3.12** Die Prp4p-Kinaseaktivität hat keinen Einfluss auf das Sedimentationsverhalten der Komplexe, die mit Prp1p, Prp31p und Cdc5p assoziiert sind. Gesamtextrakt der konditional letalen *prp4* Stämme (Tab. 3.2), die 16 Stunden mit (+Thi) und 16 Stunden ohne (-Thi) Thiamin bei 30°C gewachsen waren, wurde auf Glycerolgradienten aufgetrennt. Die Verteilung von Myc-Prp1p, HA-Prp31p und HA-Cdc5p in den Gradientenfraktionen wurde mittels Western-Analyse bestimmt.

Als ein Maß für die physiologische Integrität der Zellen in Medium mit Thiamin, wurden die Zellzykluskinase Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin herangezogen. Sowohl Cdc2p als auch  $\alpha$ -Tubulin werden im Zellzyklus konstitutiv exprimiert. Die Konzentration beider Proteine ist über den Zellzyklus konstant. Insbesondere die Veränderung der relativen Menge der Cdc2p-Kinase ist ein sehr sensibler Indikator für den Verlust der physiologischen Integrität. Deshalb wurden die relativen Mengen von Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin nach 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden in wachsenden Zellen (-Thi) bestimmt und mit den relativen Mengen von Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin nach 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium mit Thiamin (+Thi) verglichen. Die Menge von Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin bleibt in Medium mit Thiamin bis 16 Stunden konstant und nimmt danach ab (Abb. 3.13 A, B). Im Gegensatz dazu ist bei den spleißosomalen Proteinen Prp1p und Prp31p schon nach 14 Stunden in Medium mit Thiamin eine signifikante Abnahme zu beobachten (Abb. 3.13 C, D). Für Cdc5p ist nach 16 Stunden eine signifikante Abnahme zu beobachten (Abb. 3.13 E).

Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass die Abnahme der Menge von Prp1p und Prp31p eine direkte Konsequenz der Abnahme der Prp4p Kinaseaktivität ist [Käufer, persönliche Mitteilung].



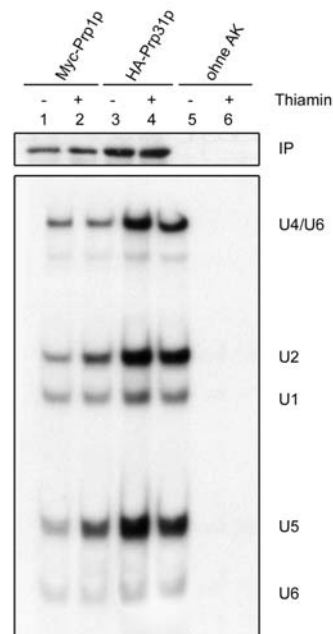
**Abb. 3.13** Quantifizierung von Prp1p, Prp31p, Cdc5p, Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin im Gesamtextrakt konditional letaler *prp4* Stämme. Es wurde Zellextrakt nach 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne Thiamin (-Thi) isoliert. Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern in der Western-Analyse nachgewiesen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Bio-Rad Quantity One Geldokumentations

software (Version 4.5.2) bestimmt. Der Proteingehalt nach 12 Stunden in Medium ohne (-Thi) bzw. mit Thiamin (+Thi) wurde auf 100 % gesetzt und der Proteingehalt nach 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium ohne bzw. mit Thiamin relativ zu diesem Wert berechnet **(A)** relativer Cdc2p Gehalt in %. Nachweis von Cdc2p im Westernblot mit Y100 Antikörpern. **(B)** relativer  $\alpha$ -Tubulin Gehalt in %. Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin im Westernblot mit TAT Antikörpern. **(C)** relativer Prp31p Gehalt in %. Nachweis von HA-Prp31p mit anti-HA Antikörpern. **(D)** relativer Prp1p Gehalt in %. Nachweis von Myc-Prp1p mit anti-Myc Antikörpern. **(E)** relativer Cdc5p Gehalt in %. Nachweis von HA-Cdc5p mit anti-HA Antikörpern. Die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen ist eingezeichnet.

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der Menge von Prp1p und Prp31p auch eine Veränderung der snRNA Komponenten der Prp1p/Prp31p Komplexe zur Folge hat, wurden nach 16 Stunden ohne und mit Thiamin aus Gesamtextrakt mit den entsprechenden Antikörpern sowohl Prp1p als auch Prp31p immunpräzipitiert und in den Immunpräzipitaten die snRNAs bestimmt.

Prp1p und Prp31p präzipitieren auch in Zellen, die das Wachstum eingestellt haben (+Thi) die snRNAs U1, U2, U5 und U4/U6 (Abb. 3.14). Das bedeutet, dass die Abnahme der Prp4p-Kinase Aktivität keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der vorhandenen prä-katalytischen Komplexe hat. Hier ist anzumerken, dass Immunpräzipitationen und die nachfolgende „Solution Hybridisation“ aus technischen Gründen nicht quantifizierbar sind. Deshalb lassen sich bei diesen Versuchen keine Aussagen darüber machen, ob nach 16 Stunden in Medium mit Thiamin die 20 % Abnahme der Menge von Prp1p und Prp31p (Abb. 3.13 C und D) auch einer Abnahme der prä-katalytischen Partikel entspricht. Es kann mit diesem Versuchsansatz nicht geklärt werden, ob die abnehmende Prp4p-Kinaseaktivität zur Folge hat, dass keine prä-katalytischen Partikel mehr zusammengebaut werden, (und) oder ob die abnehmende Kinaseaktivität dazu führt, dass die vorhandenen prä-katalytischen Spleißosomen als nicht mehr kompetente Spleißkomplexe von der Zelle sofort abgebaut werden.





**Abb. 3.14** Die Prp4p-Kinaseaktivität hat keinen Einfluss auf die U-snRNA Zusammensetzung der prä-katalytischen Prp1p/Prp31p Komplexe. Aus konditional letalen *prp4* Kulturen, wurde nach 16 Stunden ohne (-Thi) und 16 Stunden mit (+Thi) Thiamin Gesamtextrakt isoliert und Myc-Prp1p (Spur 1, 2) und HA-Prp31p (Spur 3, 4) immunpräzipitiert (IP). Die Immunpräzipitate wurden mittels Solution Hybridisation Assay auf Kopräzipitation mit U-snRNA untersucht. Ohne AK; Kontrollpräzipitation ohne Antikörper (Spur 5, 6).

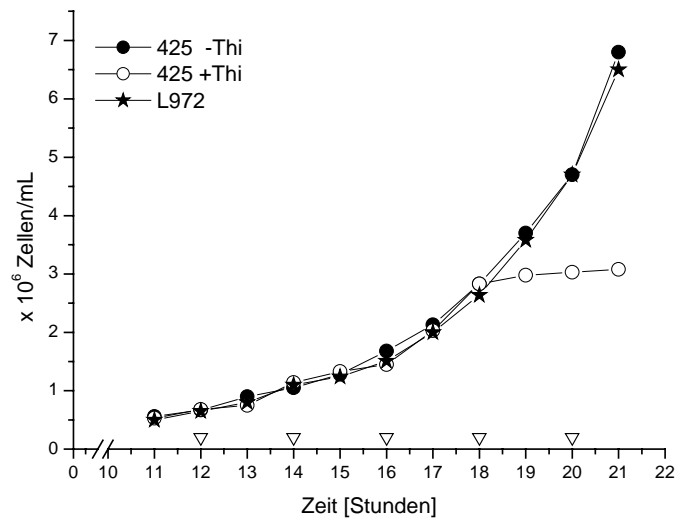
### 3.5 Prp1p ist für den Aufbau prä-katalytischer Spleißosomen nicht essentiell

Um zu prüfen, ob Prp1p eine Rolle beim Aufbau von prä-katalytischen Komplexen spielt, wurde ein Stamm konstruiert, in dem *prp1*<sup>+</sup> unter der Kontrolle des Thiamin reprimierbaren *nmt81* Promotor steht, d. h. in Medium mit Thiamin wird *prp1*<sup>+</sup> reprimiert (Tabelle 3.3).

**Tab. 3.3** Konditional letaler *prp1* *S. pombe* Stamm.

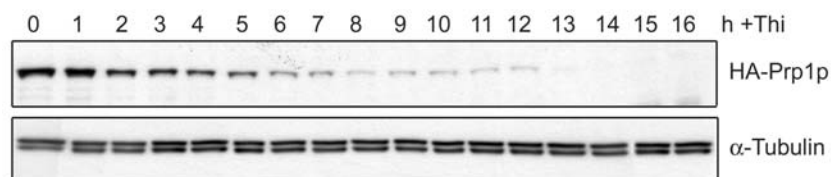
Stamm	Genotyp
425	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-294</i>

Das Wachstumsverhalten dieses Stammes bei 30°C in Medium dem kein Thiamin (-Thi) zugegeben wurde, ist mit einem Wildtyp Stamm identisch. In Medium dem Thiamin zugegeben wurde (+Thi), stellt ein konditionaler *prp1* Stamm nach 18 Stunden das Wachstum ein (Abb. 3.15).



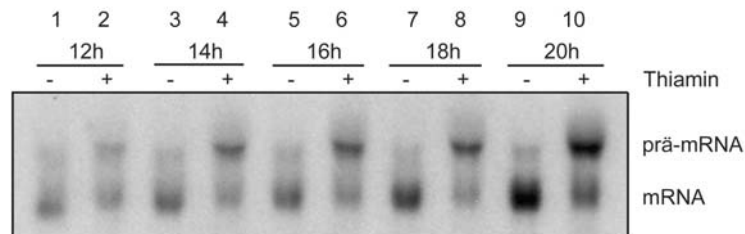
**Abb. 3.15** Wachstumsverhalten eines konditional letalen *prp1*-Stammes (425; Tab. 3.3) bei 30°C in Medium ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi). Die Dreiecke markieren die Zeitpunkte, an denen Aliquots der Kulturen zur Bestimmung der Konzentration von HA-Prp31p, Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin entnommen wurden (Siehe Abb. 3.20). L972; Wildtyp.

Zunächst wurde untersucht, wie lange in Zellen, die in Medium mit Thiamin inkubiert wurden Prp1p nachgewiesen werden kann. Nach 13 Stunden Inkubation in Medium mit Thiamin ist kein Prp1p mehr nachzuweisen (Abb. 3.16).



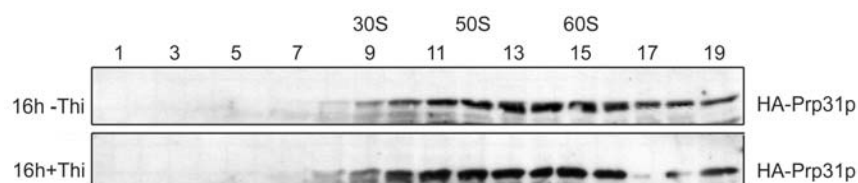
**Abb. 3.16** HA-Prp1p ist 13 Stunden nach Repression mit Thiamin nicht mehr nachzuweisen. Die Zellkultur eines konditional letalen *HA-prp1*-Stammes wurde bei 30°C in der logarithmischen Wachstumsphase mit Thiamin versetzt. Über einen Zeitraum von 16 Stunden wurde pro Stunde Proteinextrakt isoliert. Von jeder Probe wurden 100  $\mu$ g Gesamtextrakt im SDS-Gel aufgetrennt und HA-Prp1p mittels Western-Analyse sichtbar gemacht. Als interner Standard diente  $\alpha$ -Tubulin. Dazu wurde, nach Entfernen der HA-Antikörper, die Nitrocellulosemembran mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin inkubiert. Die Zeit der Probenentnahme nach Zugabe von Thiamin (h+Thi) ist angegeben.

Die Abnahme der Menge von Prp1p korreliert mit der Akkumulation von prä-mRNA. Hier ist dies am Beispiel des *tbp1<sup>+</sup>* Gens gezeigt, das drei Introns besitzt (Abb. 3.17). Das ist ein sehr deutlicher Hinweis dafür, dass die Spleißreaktion inhibiert ist, wenn kein Prp1p vorhanden ist.



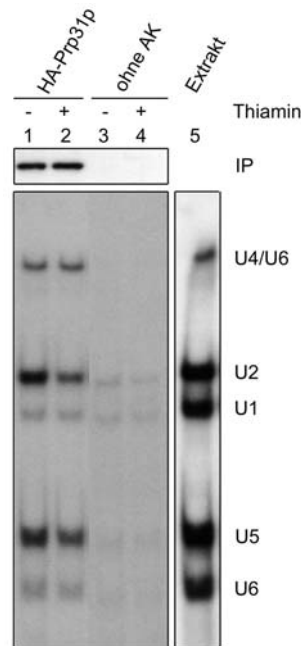
**Abb. 3.17** Akkumulation von prä-mRNA des *tbp1<sup>+</sup>*-Gens. Northernblot Analyse eines konditional letalen *prp1*-Stammes nach Inkubation bei 30°C in Medium ohne (-) sowie mit (+) Thiamin. Zu den angegebenen Stunden (h) wurde RNA isoliert und in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Als radioaktiv markierte Sonde wurde das *tbp1<sup>+</sup>*-Gen verwendet, das das TATA-Bindeprotein kodiert.

Zur Darstellung der prä-katalytischen Komplexe wurde Zellextrakt von Kulturen nach 16 Stunden in Medium ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi) isoliert, auf einem Glycerolgradienten aufgetrennt und danach mit Hilfe einer Western-Analyse die Verteilung von Prp31p im Gradienten bestimmt. Die Verteilung der Prp31p Komplexe im Glycerolgradienten ist bei beiden Bedingungen (-Thi und +Thi) gleich und zeigt das bereits bekannte Profil, wobei die Prp31p Komplexe in einem weiten Bereich von 30-80S sedimentieren. (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18** Prp31p liegt auch in Zellen ohne Prp1p in Komplexen >30S vor. Aus Stamm 425 (*h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-294*) wurde nach 16 Stunden in Medium ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi) Gesamtextrakt auf einem Glycerolgradienten aufgetrennt und die Verteilung von HA-Prp31p mit der Western-Analyse bestimmt.

Die Immunpräzipitation von HA-Prp31p aus Zellextrakt und die nachfolgende snRNA Analyse ergibt in Anwesenheit und in Abwesenheit von Prp1p die gleiche snRNA Zusammensetzung der spleißosomalen Komplexe. Prp31p ist mit prä-katalytischen Komplexen assoziiert, die U1, U2, U5 und basengepaarte U4/U6 enthalten, wobei snRNA U1 wiederum in geringerer Menge vorzuliegen scheint (Abb. 3.19).



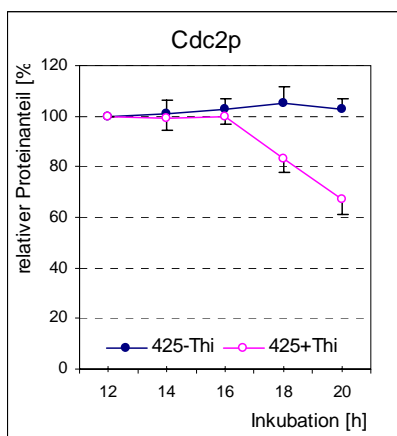
**Abb. 3.19** Prp1p ist für den Aufbau prä-katalytischer Spleißosomen nicht essentiell. Aus Gesamtextrakt des konditional letalen *prp1* Stammes wurde nach 16 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne Thiamin (-Thi) HA-Prp31p immunpräzipitiert (IP). Die Immunpräzipitate wurden mittels Solution Hybridisation Assay auf den Gehalt von U-snRNA untersucht. Ohne AK; Kontroll-IP ohne Antikörper. Extrakt; Gesamtextrakt.

Auch in diesem konditionalen *prp1* Stamm wurde die physiologische Integrität der Zellen in Medium mit Thiamin überprüft, indem in Abhängigkeit von der Zeit in Medium ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi) die relative Menge von Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin bestimmt wurde. Der Proteingehalt von Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin bleibt in Medium, dem Thiamin zugegeben wurde (+Thi) wie in dem konditionalen *prp4* Stamm bis 16 Stunden konstant und nimmt danach ab (Abb. 3.20 A, B). Unter +Thi Bedingungen bleibt in dem konditionalen *prp1* Stamm aber auch die Menge von Prp31p bis 16 Stunden konstant (Abb. 3.20 C). Unter Berücksichtigung der zuvor dargestellten Ergebnisse bedeutet dies, dass in wachsenden Zellen (-Thi), als auch in Zellen in denen die Spleißreaktion inhibiert ist und keine Prp1p Moleküle

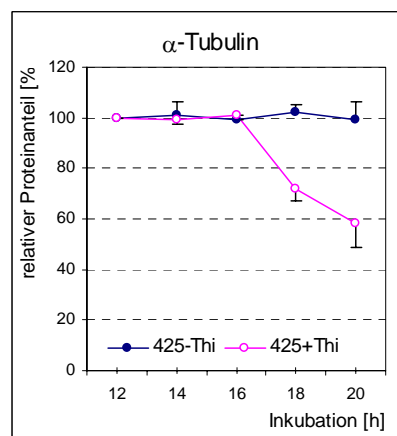
vorhanden sind, ungefähr gleiche Mengen prä-katalytischer Spleißosomen, an die Prp31p gebunden ist, vorliegen.

Das ist ein starker Hinweis, dass Prp1p nicht essentiell für den Aufbau von prä-katalytischen Spleißosomen ist, sondern an zusammengebauten Spleißosomen agiert. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird deshalb hier vorgeschlagen, dass die Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase bei der Aktivierung von prä-katalytischen Spleißosomen eine Rolle spielt. Mit dieser Arbeitshypothese im Hintergrund wurden die jetzt folgenden Experimente konzipiert.

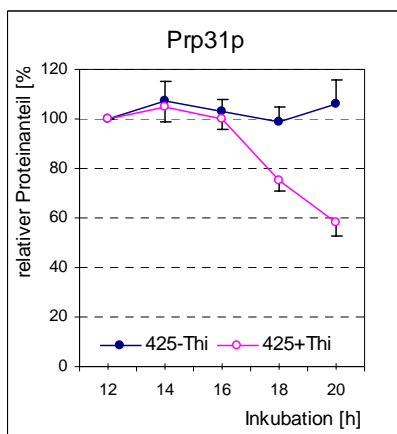
**A**



**B**



**C**

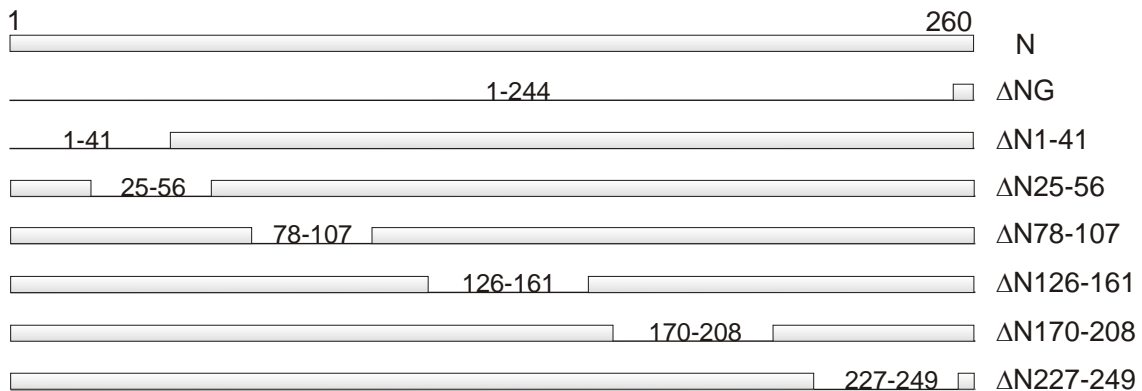


**Abb. 3.20** Quantifizierung von Prp31p, Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin in Gesamtextrakt des konditional letalen *prp1* Stammes. Nach 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne Thiamin (-Thi) wurde Gesamtextrakt isoliert. Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und HA-Prp31p, Cdc2p und  $\alpha$ -Tubulin in einer Western-Analyse mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Konzentration der Proteine wurde mit der Quantity One software (Bio-Rad; Version 4.5.2) bestimmt. Der Proteingehalt nach 12 Stunden in Medium ohne (-Thi) Thiamin wurde auf 100 % gesetzt und der Proteingehalt nach 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium ohne Thiamin relativ zu

diesem Wert berechnet. Die Werte für die Proben mit Thiamin wurden in gleicher Weise berechnet (**A**) relativer Cdc2p Gehalt in %. (**B**) relativer  $\alpha$ -Tubulin Gehalt in %. (**C**) relativer Prp31p Gehalt in %. Die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen ist eingezeichnet.

#### 3.6 Welche Rolle spielt der N-Terminus von Prp1p ?

Prp4p-Kinase phosphoryliert Prp1p *in vitro* im N-Terminus vor den Tetratricopeptid Motiven, wobei das Phosphat auf die Aminosäure Threonin transferiert wird [Schwelnus, 2004]. Deshalb wurde sowohl der gesamte N-Terminus von Prp1p (244 Aminosäuren) als auch Bereiche mit 1 bis 6 Threoninresten (20-40 Aminosäuren) im N-Terminus deletiert (Abb. 3.21) und untersucht welche Konsequenzen sich daraus für die Assoziation von Prp1p mit spleißosomalen Komplexen ergeben.



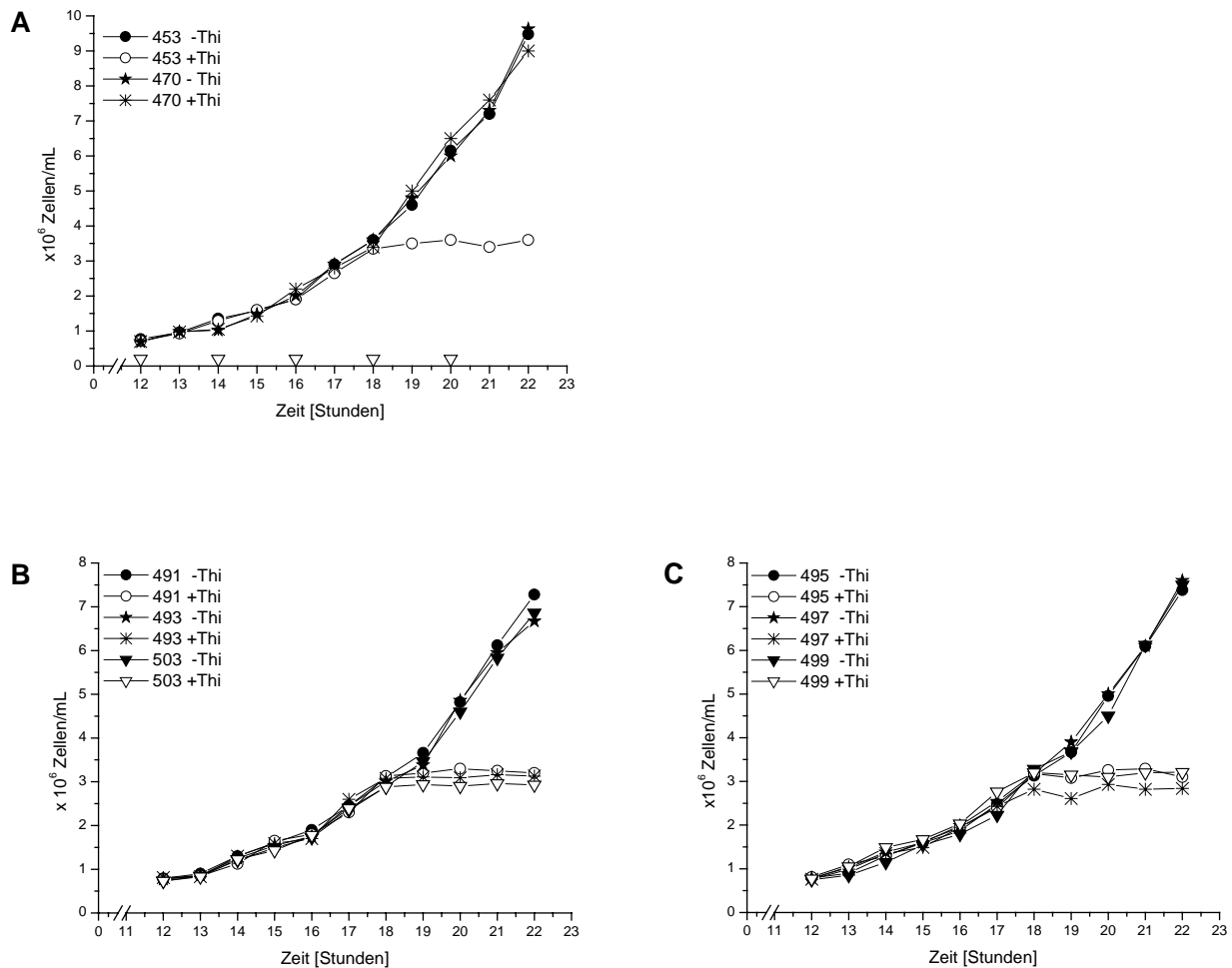
**Abb. 3.21** Schematische Darstellung der Aminosäuren 1-260 aus dem N-Terminus von Prp1p (N) und den Prp1p-Deletionsmutanten (ΔN). Deletierte Bereiche wurden durch einen Strich dargestellt.

Alle Mutantenallele wurden in das Genom von Stamm 425 ( $h^S$  *prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-294*) integriert. Diese Stämme besitzen jetzt zwei *prp1* Allele. Das eine Allel exprimiert Wildtyp Prp1p und steht unter der Kontrolle des *nmt81* Promotors, wodurch dieses Gen mit Thiamin reprimiert werden kann; das andere Allel exprimiert die N-terminalen Mutationen, wobei dieses Allel vom eigenen Promotor gesteuert wird. Zur Kontrolle wurde der Stamm 470 konstruiert, der zwei Wildtyp Allele exprimiert und das *nmt81 prp1<sup>+</sup>* Allel mit Thiamin reprimiert werden kann (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4** *S. pombe* Stämme für die Untersuchung, ob der N-Terminus von Prp1p für die Funktion von Prp1p notwendig ist.

Stamm	Genotyp
425	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-294</i>
453	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-ΔNprp1</i>
470	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1<sup>+</sup></i>
491	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ78-107</i>
493	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ126-161</i>
495	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ170-208</i>
497	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ227-249</i>
499	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ1-41</i>
503	<i>h<sup>-S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ25-56</i>

Von allen Stämmen wurde die Wachstumsrate in Medium ohne (-Thi) und nach Zugabe von Thiamin (+Thi) bei 30°C bestimmt. In Medium, dem kein Thiamin zugegeben wurde, wachsen alle Stämme mit der gleichen Wachstumsrate (Abb. 3.22; -Thi). Das bedeutet, dass die Expression von zwei *prp1<sup>+</sup>*-Genkopien in Stamm 470 keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat und die Mutantenallele in den anderen Stämmen rezessiv sind. Wird durch Zugabe von Thiamin die *nmt81prp1<sup>+</sup>*-Transkription abgeschaltet, stellen alle Stämme, die jetzt nur noch das Mutantenallel exprimieren nach 18 Stunden das Wachstum ein (Abb. 3.22; +Thi).



**Abb. 3.22** Wachstumsverhalten der Stämme aus Tabelle 3.4 bei 30°C in Medium mit (+Thi) und ohne Thiamin (-Thi). Die Dreiecke in Abb. A markieren die Zeitpunkte, an denen Aliquots der Kulturen von Stamm 453 und 470 zur Bestimmung der Konzentration von Myc-Prp1p/Myc-ΔNGPrp1p, HA-Prp31p, Cdc2p und α-Tubulin entnommen wurden (Abb. 3.25).

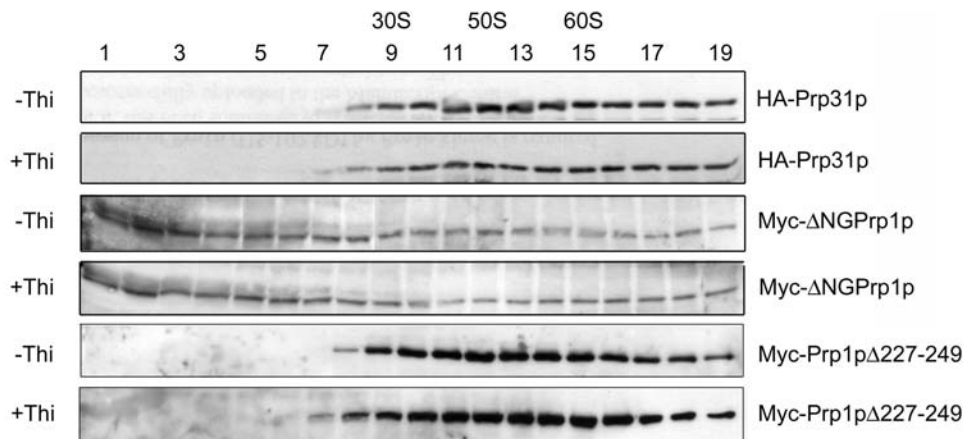
Jetzt wurde untersucht, ob die mutierten Prp1p Moleküle *in vivo* nach wie vor mit spleißosomalen Komplexen assoziiert sind. Dazu wurde Extrakt aus diesen Stämmen nach 16 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne (-Thi) Thiamin isoliert, in einem Glycerolgradienten aufgetrennt und dann das Sedimentationsprofil von Prp31p und der ΔNPrp1p Moleküle bestimmt. Prp31p sedimentiert wie erwartet immer in der Region von 30-80S. Deshalb wird hier nur das Profil für einen Extrakt dargestellt (Abb. 3.23; HA-Prp31p).

Alle kurzen Deletionen im N-terminalen Bereich von Prp1p verursachen keine Veränderung des Sedimentationsprofils der ΔNPrp1p Proteine, deshalb wird auch hier beispielhaft nur ein Profil dargestellt (Abb. 3.23; Myc-Prp1pΔ227-249). Eine



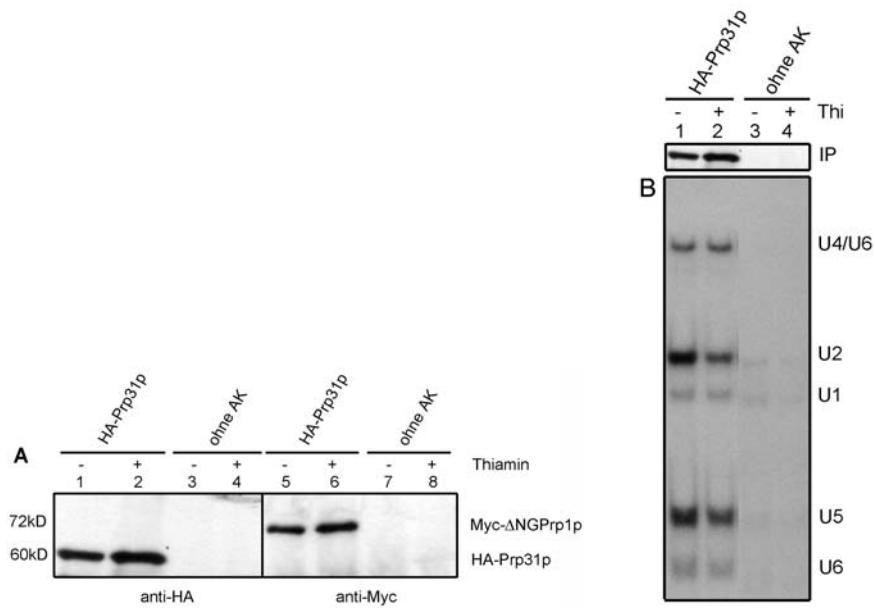
Immunpräzipitation mit den entsprechenden Antikörpern und anschließender snRNA Analyse zeigt, dass  $\Delta$ NPrp1p in allen Extrakten mit U1.U2.U5.U4/U6 assoziiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Deletion des gesamten N-terminalen Bereichs führt jedoch zu einer Veränderung des Sedimentationsprofils.  $\Delta$ NGPrp1p sedimentiert bei beiden Bedingungen in allen Dichtebereichen des Gradienten (Abb. 3.23; Spur 1-19:  $\Delta$ NGPrp1p, +/-Thi).



**Abb. 3.23** Myc- $\Delta$ NGPrp1p sedimentiert in allen Dichtebereichen des Gradienten. Gesamtextrakt aus Stamm 453 und 497 (Tab. 3.4) wurden nach 16 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne (-Thi) Thiamin im Glycerolgradienten aufgetrennt. HA-Prp31p, Myc- $\Delta$ NGPrp1p und Myc-Prp1p $\Delta$ 227-249 wurden in den Fraktionen mittels Western-Analyse nachgewiesen.

Um festzustellen, ob Myc- $\Delta$ NGPrp1p noch mit Spleißkomplexen assoziiert, wurde HA-Prp31p aus Gesamtextrakt mit anti-HA Antikörper präzipitiert (Abb. 3.24 A, Spur 1 und 2). Eine Western-Analyse der HA-Immunpräzipitate mit anti-Myc Antikörper zeigt, dass in Medium ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi) Myc- $\Delta$ NGPrp1p mit HA-Prp31p kopräzipitiert (Abb. 3.24 A, Spur 5 und 6). Die snRNA Analyse der HA-Prp31p Immunpräzipitate ergibt das bekannte Bild. Die spleißosomalen Partikel die von HA-Prp31p kopräzipitiert werden, bestehen aus den snRNAs U2, U1, U5 und U4/U6, wobei hier wieder sehr deutlich wird, dass der Anteil von U1 snRNA wesentlich geringer ist (Abb. 3.24 B; Spur 1, 2).



**Abb. 3.24** Myc-ΔNGPrp1p ist mit prä-katalytischen Spleißosomen assoziiert. Nach 16 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne (-Thi) Thiamin wurde HA-Prp31p aus Gesamtextrakt von Stamm 453 immunpräzipitiert (**A**: Spur 1, 2, 5, 6). In den Immunpräzipitaten wurde HA-Prp31p (Spur 1, 2) und Myc-ΔNGPrp1p (Spur 5, 6) mittels Western-Analyse nachgewiesen. (**B**) Die Immunpräzipitate (IP) wurden mit Hilfe des Solution Hybridisation Assays auf snRNAs U1, U2, U5 und U4/U6 untersucht. Ohne AK; Kontroll-IP ohne Antikörper.

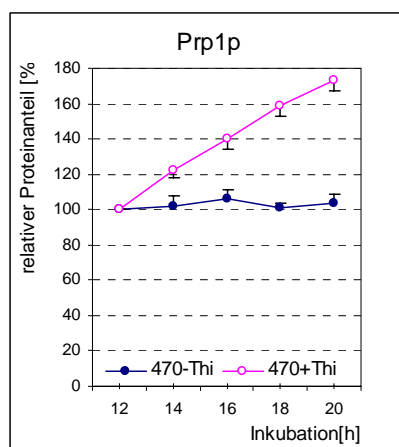
Die anti-Myc Antikörper immunpräzipitieren keine spleißosomalen Myc-ΔNGPrp1p Komplexe mit U-snRNA, sondern nur freies Myc-ΔNGPrp1p (Ergebnisse nicht gezeigt), obwohl ΔNGPrp1p mit dem spleißosomalen Prp31p Komplex kopräzipitiert (Abb. 3.24 A). Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen, die sich gegenseitig nicht ausschließen. Bei der Immunpräzipitation mit anti-Myc Antikörper konkurrieren das freie und das komplexierte Protein (Antigen) um die Bindung mit dem Antikörper. Das freie Protein könnte entweder besser für den Antikörper zugänglich sein, und/oder in einer höheren Konzentration als das komplexierte Protein vorliegen. Deshalb kann hier nicht geklärt werden, ob im Vergleich mit Prp1p weniger ΔNGPrp1p Moleküle mit einem spleißosomalen Komplex assoziiert sind.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass alle Bereiche im N-Terminus von Prp1p für die Funktion von Prp1p essentiell sind, da alle Stämme, die nur das N-terminal deletierte Prp1p exprimieren das Wachstum einstellen (Abb. 3.22).

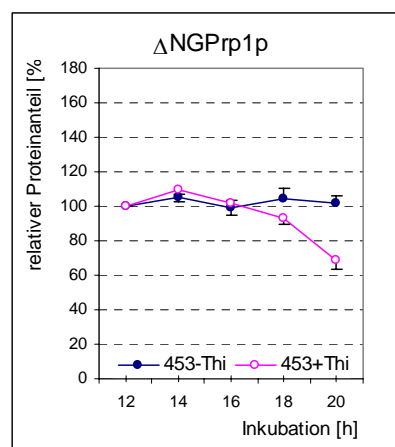
### 3.7 Eine unerwartete regulatorische Reaktion nach Repression von *nmt81prp1<sup>+</sup>* und konstitutiver Expression von *prp1<sup>+</sup>*

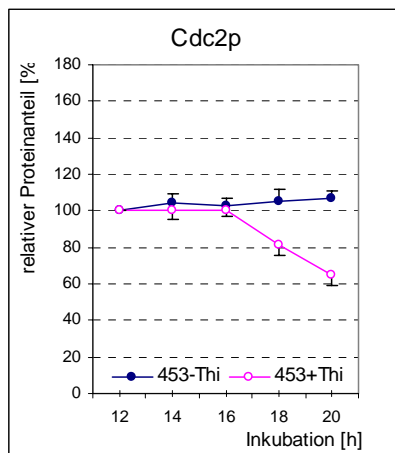
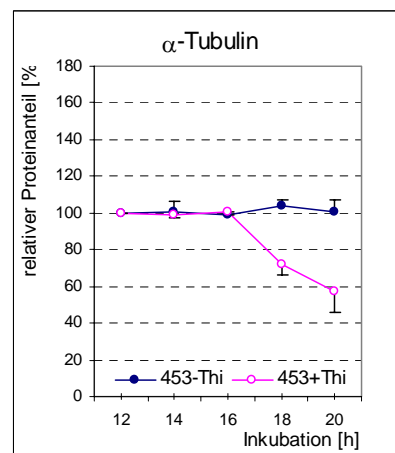
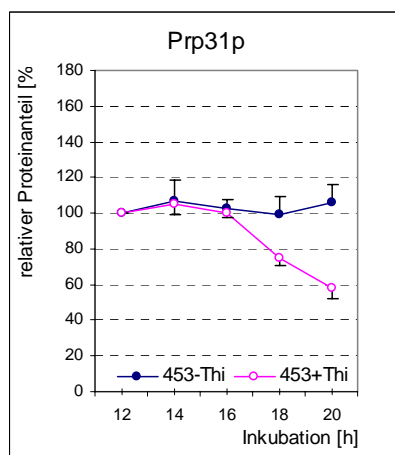
Nur die Deletion des gesamten N-Terminus ( $\Delta$ NG) von Prp1p führt dazu, dass ein großer Teil der mutierten Prp1p Moleküle nicht mehr mit spleißosomalen Komplexen assoziiert. Da bei einer Deletion dieser Größenordnung durch die Strukturveränderungen des Proteins auch die Stabilität des Proteins wesentlich beeinflusst werden könnte, wurde der Proteingehalt von Myc- $\Delta$ NGPrp1p in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in beiden Medien (-Thi und +Thi) bestimmt und mit dem Proteingehalt von Myc-Prp1p in Stamm 470 verglichen. In Medium, ohne Zusatz von Thiamin (-Thi), in dem beide Allele exprimiert werden, bleibt sowohl der Gehalt von Myc-Prp1p als auch der von Myc- $\Delta$ NGPrp1p gleich (Abb. 3.25 A und B (-Thi)). In Medium mit Thiamin (+Thi) nimmt der Proteingehalt von Myc- $\Delta$ NGPrp1p nach 16 Stunden ab. Myc- $\Delta$ NGPrp1p verhält sich unter diesen Bedingungen wie Cdc2p,  $\alpha$ -Tubulin und Prp31p und zeigt damit an, dass bis 16 Stunden die physiologische Integrität der Zellen gewährleistet ist, während nach 16 Stunden als Folge des Spleißdefekts die Zellen ihre physiologische Integrität verlieren (Abb. 3.25 B, C, D und E; +Thi). Jedoch völlig unerwartet nimmt in Stamm 470, wenn nur ein Allel exprimiert wird (+Thi), der Proteingehalt von Myc-Prp1p zu. Bei dieser Bedingung wird nur noch das *Myc-prp1<sup>+</sup>* Allel exprimiert, das vom eigenen Promotor gesteuert wird (Abb. 3.25 A; (+Thi)).

A



B



**C**

**D**

**E**


**Abb. 3.25** Proteinquantifizierung im Gesamtextrakt von Stamm 470 (A) und 453 (B-E). Zellextrakt von Stamm 470 und 453, wurde nach 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium mit (+Thi) und ohne (-Thi) Thiamin isoliert. Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Myc- $\Delta$ NGPrp1p, Myc-Prp1p, Cdc2p,  $\alpha$ -Tubulin und HA-Prp31p mit spezifischen Antikörpern in der Western-Analyse nachgewiesen. Der Proteingehalt wurden mit der Bio-Rad Quantity One Geldokumentations software (Version 4.5.2) bestimmt. Der Proteingehalt nach 12 Stunden in Medium mit (+Thi;) bzw. ohne Thiamin (-Thi) wurde auf 100 % gesetzt und der Proteingehalt nach 14, 16, 18 und 20 Stunden in Medium mit bzw. ohne Thiamin relativ zu diesem Wert berechnet (**A**) relativer Myc-Prp1p Gehalt und (**B**) relativer Myc- $\Delta$ NGPrp1p Gehalt in %. (**C**) relativer Cdc2p Gehalt in % (**D**) relativer  $\alpha$ -Tubulin Gehalt in %. (**E**) relativer HA-Prp31p Gehalt in %. Die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen ist eingetragen.

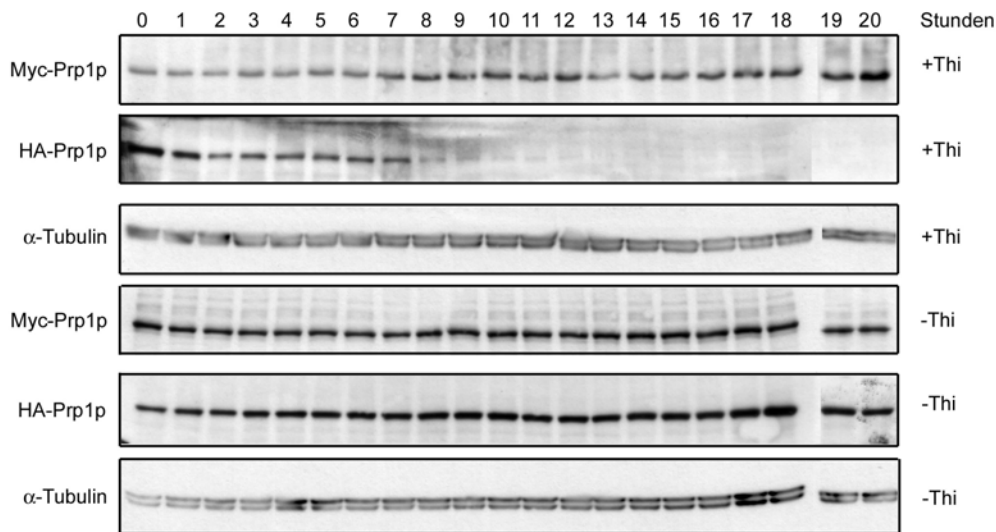
Zur Aufklärung dieses Phänomens wurde ein Stamm konstruiert in dem beide *prp1*<sup>+</sup>-Allele mit einem Epitop fusioniert sind. Das Thiamin regulierbare Gen exprimiert HA-Prp1p, das andere Gen exprimiert Myc-Prp1p (Tab. 3.5).

**Tab. 3.5** Genotyp von Stamm 523.

Stamm	Genotyp
523	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81HA-prp1<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1<sup>+</sup></i>

Auch dieser Stamm hat bei 30°C die gleiche Wachstumsrate wie ein Wildtyp Stamm (Ergebnis nicht gezeigt). Für den folgenden Versuchsansatz wurde eine Zellkultur, die bei 30°C in Medium ohne Thiamin (-Thi) inkubiert worden war, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in zwei Kulturen aufgeteilt. Durch Zugabe von Thiamin (+Thi) wurde in einer Kultur das *nmt81HA-prp1*<sup>+</sup> Gen reprimiert. Beide Kulturen wurden bei 30°C inkubiert und über einen Zeitraum von 20 Stunden pro Stunde Proteinextrakt isoliert. Danach wurden gleiche Mengen Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe einer Western-Analyse wurde HA-Prp1p und Myc-Prp1p nachgewiesen.

Das Ergebnis dieser Analyse ist eindeutig. Wenn beide Gene exprimiert werden (-Thi) bleibt die Menge von HA-Prp1p und Myc-Prp1p über 20 Stunden konstant (Abb. 3.26 -Thi). In Medium +Thi nimmt die Menge von Myc-Prp1p deutlich zu, wenn kein HA-Prp1p mehr nachzuweisen ist (Abb. 3.26; Spur 8 +Thi). Die Zunahme der Menge von Myc-Prp1p korreliert mit der Abnahme der Menge von HA-Prp1p (Abb. 3.26 +Thi). Das könnte bedeuten, dass die funktionelle Menge von Prp1p in der Zelle „gemessen“ und reguliert wird. Da die Menge von Myc-ΔNGPrp1p nicht ansteigt, sondern konstant bleibt, wenn das Wildtyp Allel reprimiert ist (Abb. 3.25 B, +Thi), bedeutet dies, dass sich der Schalter dieser regulatorischen Funktion im N-Terminus von Prp1p befindet. Da Prp4p-Kinase Prp1p im N-Terminus phosphoryliert, könnte die Kinase an diesem Regulationsmechanismus beteiligt sein. Deshalb werden im Folgenden die Phosphorylierungsstellen der Prp4p Kinase im N-Terminus von Prp1p bestimmt.



**Abb. 3.26** Die Myc-Prp1p Konzentration nimmt nach Abschalten der *HA-prp1*<sup>+</sup> Transkription in Stamm 523 (Tab. 3.5) zu. Zellen wurden über 20 Stunden in Medium ohne (-Thi) und mit (+Thi) Thiamin inkubiert. Zu jeder Stunde wurde Gesamtextrakt isoliert. Je 100  $\mu$ g Gesamtextrakt wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Western-Analyse HA-Prp1p und Myc-Prp1p nachgewiesen.  $\alpha$ -Tubulin diente als interner Standard.

### 3.8 Identifizierung der *in vitro* Phosphorylierungsstellen von Prp1p

Im N-Terminus von Prp1p befinden sich 17 Threoninreste die potentiell von der Prp4p-Kinase phosphoryliert werden können. Eine Voraussage, in welchem Kontext diese Threoninreste als Substrat für die Prp4p-Kinase dienen, war nicht möglich, da Prp1p das einzige, bisher bekannte physiologische Substrat von Prp4p ist. Der Versuch, die Phosphorylierungsstellen mit Hilfe einer synthetischen Peptidbibliothek zu bestimmen, in der alle 17 Threoninreste in ihrem natürlichen Kontext vorlagen, war nicht erfolgreich. Auch mit Hilfe der Massenspektroskopie gelang es nicht, phosphorylierte Peptide zu identifizieren [Schwelnus *et al.*, 2004].

Deshalb wurden schließlich in einer Tour de Force die Threoninreste im N-Terminus von Prp1p (Abb. 3.27) einzeln und in Kombination mit Hilfe gerichteter Mutagenese mutiert. Dabei wurde nach der Methode von Kunkel *et al.* [1987] Threonin (T) zu Alanin (A) mutiert. Die Expression der mutierten Proteine erfolgte in Bakterien. Nach Aufreinigung aus dem Bakterien-Extrakt wurde Prp1p mit rekombinantem Prp4p und  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP in *in vitro* Kinase Assays eingesetzt [Schwelnus, 2004]. Danach wurde Prp1p mittels SDS-PAGE von Prp4p abgetrennt, aus dem Gel eluiert, mit

Chymotrypsin proteolytisch gespalten und auf Cellulose Dünnschichtchromatographieplatten in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die phosphorylierten Peptide wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

```

MANF↓Y↓PDF↓LN  MQPPPNY↓VAG  LGRGAT26GF↓T29T30  RSDLGPAQEL  40
PSQESIKAAI  EQRKSEIEEE  EDIDPRY↓QDP  DNEVALF↓AT79A  80
PY↓DHEDEEAD  KIY↓QSVEEHL  SKRRKSQREK  QEQLQKEKY↓E  120
KENPKVSSQF↓  ADLKRGLST139L  T141DEDW↓NNIPE  PGDLT155RKKRT160  160
KQPRRERF↓Y↓A  T171SDF↓VLASAR  NENQAISNF↓A  VDT193QAGT197ET199P  200
DMNGT205KT207NF↓V  EIGAARDKVL  GIKLAQASSN  LT232SPST236IDPK  240
GY↓LT244SLNSMV  PKNANDLGDI  RKARKLLQSV  IETNPKHASG W↓.....  281
  
```

**Abb. 3.27** N-terminale Aminosäuresequenz von Prp1p. Die Threoninreste wurden hervorgehoben und nummeriert. Chymotrypsin spaltet nach den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin [van der Geer *et al.*, 1993]. Bei vollständiger Spaltung von Prp1p durch Chymotrypsin entstehen 48 Peptide. Die N-terminalen Peptide sind abgebildet. Die Spaltstellen sind durch einen Pfeil markiert.

Im Folgenden wird eine spezifische Auswahl der Phosphopeptidanalysen vorgestellt und diskutiert.

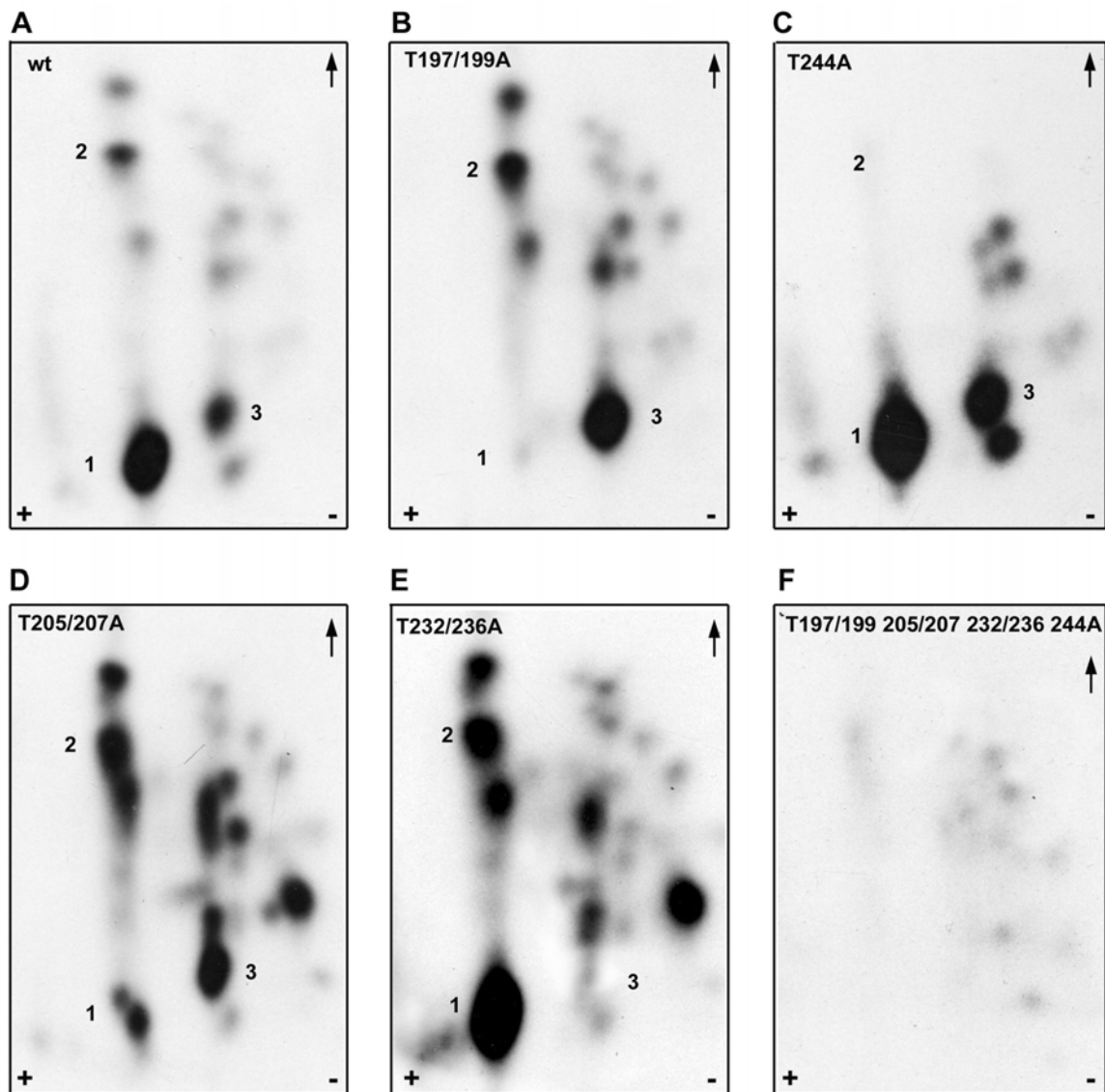
Die Phosphopeptidanalyse von Wildtyp-Prp1p (wt-Prp1p) ergibt drei starke und 12-14 schwache <sup>32</sup>P-Signale. Dieses Phosphopeptidmuster ist für wt-Prp1p bei proteolytischer Spaltung mit Chymotrypsin reproduzierbar (Abb. 3.28 A). Das Phosphopeptidmuster der Mutation T26/29/30A-Prp1p zeigt keinen Unterschied zum Phosphopeptidmuster von wt-Prp1p (Ergebnis nicht gezeigt). Die drei Threoninreste in diesen Positionen sind Teil der hoch konservierten Sequenz am Beginn des N-Terminus von Prp1p (siehe Einleitung, Abb. 2.4, S. 9). Im Phosphopeptidmuster der Mutation T197/199A-Prp1p verschwindet das stärkste der drei <sup>32</sup>P-Signale (Abb. 3.28 B, Signal 1). Im Vergleich mit wt-Prp1p fehlt im Phosphopeptidmuster der Mutation T244A-Prp1p ein weiteres der drei starken Signale (Signal 2), wobei sich hier auch das gesamte Phosphopeptidmuster verändert und, unter anderem, ein bisher schwaches Signal sehr stark wird (Abb. 3.28 C). Das Threonin in Position 244

befindet sich in der hoch konservierten Sequenz am Ende des N-Terminus von Prp1p (siehe Einleitung, Abb. 2.4, S. 9). Im Phosphopeptidmuster der Mutation T232/236A-Prp1p fehlt das dritte starke  $^{32}\text{P}$ -Signal (Signal 3). Auch hier erscheint ein starkes Signal, das in den bisherigen Peptidmaps nur sehr schwach vorhanden ist (Abb. 3.28 E). Das Phosphopeptidmuster der Mutation T205/207A-Prp1p ist nicht eindeutig zu interpretieren, außer, dass das gleiche starke  $^{32}\text{P}$ -Signal wie im Peptidmap der Mutation T232/236A hinzukommt (Abb. 3.28 D). Im Peptidmuster eines Prp1p, das eine Kombination dieser Mutationen im N-Terminus besitzt (T197/199/205/207/232/236/244A-Prp1p) verschwinden alle starken  $^{32}\text{P}$ -Signale und nur noch wenige schwache Signale werden sichtbar (Abb. 3.28 F). Die hier vorgestellten Phosphopeptidanalysen lassen den Schluss zu, dass die Prp4p-Kinase *in vitro* Threoninreste im N-Terminus von Prp1p in unterschiedlichem Kontext phosphoryliert. Dazu gehört das Threonin in Position 244, die Positionen 232 und/oder 236 und die Positionen 197 und/oder 199 (Abb. 3.28). Die Threoninreste in den Positionen 205 und 207, befinden sich auf dem gleichen Chymotrypsinfragment wie die Threoninreste in Position 197 und 199. Anhand der Phosphopeptidmuster kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Positionen 205 und 207 auch phosphoryliert werden (Abb. 3.28 D und Abb. 3.27).

#### **Phosphorylierung von Prp1p *in vivo***

Die Substratspezifität von Kinasen *in vitro* muss nicht mit ihrer Substratspezifität *in vivo* übereinstimmen. Deshalb wurde überprüft, welche Peptide in Prp1p *in vivo* phosphoryliert werden. Dies war allerdings aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Die Peptidmaps nach *in vivo* Phosphorylierung mit [ $^{32}\text{P}$ ]-*ortho*-Phosphorsäure zeigen, dass das Threonin an Position 244 auch *in vivo* phosphoryliert wird. Die Positionen 197/199 und 232/236 werden scheinbar *in vivo* nicht phosphoryliert. Allerdings erscheint auf dem *in vivo* Peptidmuster ein zweites Phosphopeptid, das *in vitro* nur schwach phosphoryliert wird und bisher nicht identifiziert werden konnte [Voges und Käufer, persönliche Mitteilung]. Bei einer *in vivo* Markierung ist das Verhältnis von radioaktiv markierten, zu nicht markierten Prp1p Molekülen in den Zellen sehr gering [Schwelnus *et al.*, 2001]. Das ist ein Hinweis, dass die Phosphorylierung von Prp1p Teil einer geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion ist. Allerdings wird dadurch die Erstellung von Peptidmaps eine große Herausforderung.





**Abb. 3.28** Phosphopeptidmap von Wildtyp Prp1p (A) und von Prp1p-Mutanten (B-F). Die Proteine wurden in Anwesenheit von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP *in vitro* mit rekombinanter Prp4p-Kinase phosphoryliert und anschließend mit Chymotrypsin gespalten. Die Peptide wurden auf Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte in der ersten Dimension mittels Elektrophorese und in der zweiten Dimension durch Chromatographie. Die Orientierung der positiven (+) und negativen Elektroden (-) sowie die Laufrichtung (↑) des Chromatographiepuffers sind eingezeichnet [Schwelnus, persönliche Mitteilung].

### 3.9 Auswirkungen von Punktmutationen im N-Terminus von Prp1p auf Wachstum und Assoziation mit spleißosomalen Komplexen

Der Aminosäurekontext der *in vivo* Phosphorylierungsstelle in Position 244 ist in anderen Organismen hoch konserviert. Die zweite hoch konservierte Region im N-Terminus von Prp1p befindet sich in der Region von Aminosäure 21-33 (siehe Einleitung, Abb. 2.4, S. 9). Deletionsmutationen in beiden Bereichen führten zu einem Wachstumsstopp (Abb. 3.22, 497 und 499 (+Thi); S. 33), wobei das mutierte  $\Delta$ Prp1p in beiden Fällen nach wie vor mit spleißosomalen Komplexen assoziiert gefunden wurde (Abb. 3.23, S. 34).

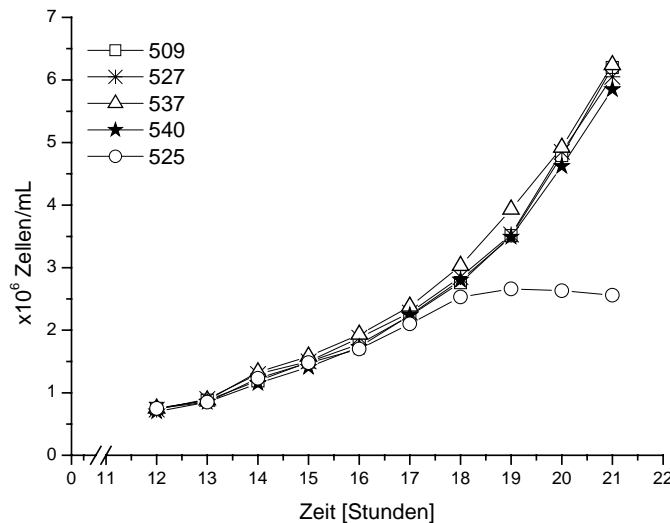
Im Folgenden wird zuerst untersucht welche Konsequenzen die Expression von Punktmutationen im N-Terminus von Prp1p für das Wachstum der Zelle hat. Dazu wurden wie zuvor die Mutantenallele in das Genom des Stamms 425 integriert, der zusätzlich ein Thiamin regulierbares *nmt81prp1*<sup>+</sup> Allel besitzt (Absatz 3.6, S. 31).

**Tab. 3.6** *S. pombe* Stämme, mit Punktmutationen im N-Terminus von *prp1*.

Stamm	Genotyp
509	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1</i> (T26/29/30A)
527	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1</i> (T244A)
537	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1</i> (T197/199A/205/207)
540	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1</i> (T232/236/244)
525	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1</i> (T26/29/30/197/199/205/207/232/236/244A)

Für alle in Tab. 3.6 aufgeführten Hefestämme wurden die Wachstumsraten ohne (-Thi) und mit Thiamin (+Thi) bestimmt. In Thiamin-freiem (-Thi) Medium haben alle Stämme die gleiche Wachstumsrate, d. h. alle *prp1* Mutantenallele sind rezessiv (Ergebnisse nicht gezeigt). In Medium mit Thiamin (+Thi), wenn nur noch das mutierte Allel exprimiert wird, wachsen ebenfalls die Stämme mit den Mutationen *prp1*(T244A), *prp1*(T26/29/30A), *prp1*(T197/199/205/207A), *prp1*(T232/236/244A) mit der gleichen Wachstumsrate. Nur der Stamm 525, der alle diese Mutationen in einem

Allel kombiniert besitzt, *prp1*(T26/29/30/197/199/205/207/232/236/244A), stellt nach 18 Stunden das Wachstum ein (Abb. 3.29).

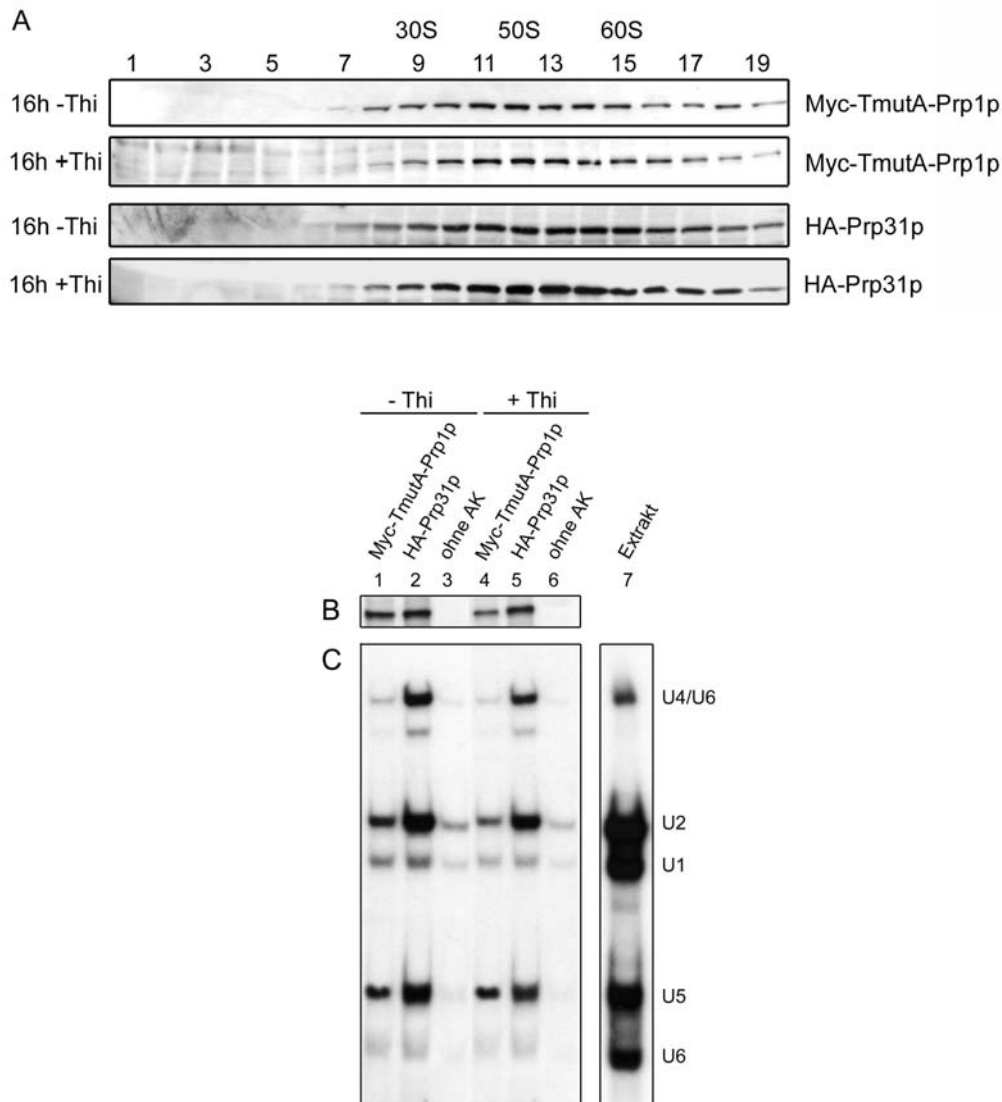


**Abb. 3.29** Wachstumsverhalten der Hefestämme aus Tabelle 3.6 bei 30°C in Medium mit Thiamin. Nur der Stamm 525, der das Mutanten-Allel *Myc-prp1*(T26/29/30/197/199/205/207/232/236/244A) besitzt, stellt nach 18 Stunden das Wachstum ein.

Deshalb wurde nach 16 Stunden in Medium ohne (-Thi) und mit (+Thi) Thiamin Extrakt von Zellkulturen dieses Stammes isoliert, in einem Glyceringradienten aufgetrennt und dann das Sedimentationsprofil von Myc-T26/29/30/197/199/205/207/232/236/244A-Prp1p (Myc-TmutA-Prp1p) und HA-Prp31p bestimmt. Wie erwartet, sedimentiert Prp31p in der Region von 30-80S (Abb.3.30 A; HA-Prp31p, +/-Thi). Auch Myc-TmutA-Prp1p sedimentiert bei beiden Bedingungen in der Region von 30-80S. Es werden keine Myc-TmutA-Prp1p Moleküle in der Region <30S nachgewiesen (Abb. 3.30 A; Myc-TmutA-Prp1p, +/-Thi). Das bedeutet, dass Myc-TmutA-Prp1p immer noch mit spleißosomalen Komplexen assoziiert ist.

Immunpräzipitationen aus Gesamtextrakt mit anti-Myc und anti-HA Antikörper, von Kulturen ohne (-Thi) Thiamin und mit (+Thi) Thiamin Zugabe, und nachfolgende snRNA Analyse bestätigen, dass Myc-TmutA-Prp1 an prä-katalytische Spleißosomen bindet, die aus den snRNAs U1, U2, U5 und U4/U6 bestehen (Abb. 3.30 C). Das ist ein zusätzlicher Hinweis, dass weder die hochkonservierte Region in den Positionen 20-33 im N-Terminus von Prp1p, noch die Phosphorylierung des Threonins in Position 244 *in vivo* eine Rolle spielen für die Assoziation von Prp1p mit prä-

katalytischen Spleißkomplexen. Obwohl die Identifizierung der zweiten *in vivo* Phosphorylierungsstelle noch aussteht, lassen die vorgestellten Ergebnisse den Schluss zu, dass die Phosphorylierung des Threonins in Position 244 von Prp1p durch Prp4p-Kinase ein wesentlicher Teil des Regulationsmechanismus ist, der in *S. pombe* zur Aktivierung von prä-katalytischen Spleißosomen führt.



**Abb. 3.30** Myc-TmutA-Prp1p ist mit prä-katalytischen Spleißosomen assoziiert. Aus Stamm 525 (Tab. 3.6) wurde nach 16 Stunden in Medium ohne (-Thi) und mit (+Thi) Thiamin Gesamtextrakt isoliert. **(A)** Der Gesamtextrakt wurde im Glycerolgradienten aufgetrennt und die Fraktionen mittels Western-Analyse auf Myc-TmutA-Prp1p und HA-Prp31p untersucht. **(B)** Myc-TmutA-Prp1p (Spur 1, 4) und HA-Prp31p (Spur 2, 5) wurden aus Gesamtextrakt immunpräzipitiert. In den Immunpräzipitaten wurde Myc-TmutA-Prp1p mittels Westen-Analyse nachgewiesen (Spur 1, 2, 4, 5). **(C)** Die Immunpräzipitate wurden im Solution Hybridisation Assay auf den Gehalt von U-snRNA untersucht. Ohne AK; Kontrollpräzipitation ohne Antikörper (Spur 3, 6). Gesamtextrakt (Spur 7).

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die Phosphorylierung von Prp1p durch die Prp4p-Kinase im Spleißprozess spielt. Der Ausgangspunkt des Projektes war die Entdeckung, dass Prp4p-Kinase eine zentrale Rolle bei der Regulation des prä-mRNA Spleißens spielt und der Nachweis, dass Prp1p ein physiologisches Substrat von Prp4p-Kinase ist [Alahari *et al.*, 1993, Schwelnus *et al.*, 2001]. Zu Beginn der Arbeit war nicht bekannt auf welcher Ebene dieser Regulationsmechanismus anzusiedeln ist, da alle in der Literatur vorgeschlagenen Hypothesen zur Regulation des Spleißprozesses auf Untersuchungen mit *in vitro* Spleißsystemen basieren [Brow 2002, Burge *et al.*, 1999, Staley und Guthrie, 1998]. Es wurde noch nicht untersucht, ob in einem *in vitro* Säuger-Spleißsystem PRP4K Kinaseaktivität für eine Spleißreaktion gebraucht wird. Die Hefe *S. cerevisiae*, das zweite Modellsystem, besitzt keine Kinase, die Prp4p entspricht (siehe Einleitung).

Da mit Extrakt aus der Spaltheife *S. pombe* trotz großer Anstrengungen verschiedener Arbeitsgruppen kein *in vitro*-Spleißsystem etabliert werden konnte, wurde in dieser Arbeit zuerst untersucht, ob und an welchen spleißosomalen Komplexen Prp4p-Kinase und Prp1p in Zellextrakt gefunden werden. Bei diesem *in vivo* Ansatz ist zu berücksichtigen, dass das Spleißosom eine sehr dynamische Struktur aus snRNAs und Proteinen ist und deshalb bei der Aufarbeitung von Extrakten die Salzkonzentration der Puffersysteme eine entscheidende Rolle spielt. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen wurde festgestellt, dass Prp4p-Kinase in Zellextrakt nicht an spleißosomale Komplexe gebunden vorliegt, während Prp1p und Prp31p ausschließlich an Partikel gebunden vorliegen, die in dem Bereich >30 S sedimentieren und die snRNAs U1.U2.U5.U4/U6 enthalten (S. 18 Abb. 3.7 A und B). In Bezug auf die Zusammensetzung der snRNAs entspricht dieser Komplex einem noch nicht aktivierten Spleißosom, das man als prä-katalytisches Spleißosom bezeichnen könnte [Kuhn und Käufer 2003, Makarov *et al.*, 2002]. In allen Analysen zur Bestimmung des Gehalts der U-snRNAs in den prä-katalytischen Spleißosomen mit denen Prp1p und Prp31p assoziiert, scheint snRNA U1 in geringerer Menge vorzuliegen als die snRNAs U2, U5 und U4/U6 (S. 13 Abb. 3.2; S. 15 Abb. 3.4; S. 26 Abb. 3.14; S. 35 Abb. 3.24 B und S. 45 Abb. 3.30 C). Die Sedimentationsanalysen ergaben eine relativ breite Verteilung der prä-katalytischen Spleißosomen im Dichtegradient (30-80S), woraus zu schließen ist, dass Partikel unterschiedlicher Größe vorliegen (S. 18 Abb. 3.7; S. 23 Abb. 3.12; S. 34 Abb. 3.23; S. 45 Abb. 3.30

A). Deshalb ist es möglich, dass in diesem Bereich zwei Partikel sedimentieren, die die snRNPs U2.U5.U4/U6 (tetra-snRNP) und U1.U2.U5.U4/U6 (penta-snRNP) enthalten, wobei das tetra-snRNP in höherer Konzentration als das penta-snRNP vorliegt. Diese Interpretation wird durch weitere Befunde gestützt. Vor kurzer Zeit wurde mithilfe von Affinitätschromatographie aus *S. pombe* ein 50S Komplex isoliert und charakterisiert. Der Komplex enthielt Prp1p, Prp31p und alle Proteine, die spezifisch mit den snRNAs U2, U5 und U4/U6 assoziieren. In diesem Komplex wurden keine Proteine identifiziert, die als spezifische snRNA U1 Proteine bekannt sind. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich um einen spleißosomalen Komplex handelt, der aus den vier snRNPs U2.U5.U4/U6 (tetra-snRNP) besteht [Carnahan *et al.*, 2005].

Die Repression von Prp4p-Kinase führt zu keiner Veränderung der prä-katalytischen Partikelgrößen im Dichtegradienten. Das Sedimentationsverhalten der prä-katalytischen Spleißosomen ist mit und ohne Kinaseaktivität identisch, aber die Abnahme der Kinaseaktivität korreliert mit der Abnahme der Menge von Prp1p und Prp31p, das an die prä-katalytischen Spleißosomen gebunden ist (S. 23 Abb. 3.12. und S. 24 Abb. 3.13 C und D). Das könnte als Hinweis gewertet werden, dass ohne Kinaseaktivität keine Spleißosomen zusammengebaut und möglicherweise die prä-katalytischen, spleißosomalen Partikel degradiert werden.

Um zu klären, ob Prp1p für den Zusammenbau von prä-katalytischen Spleißosomen gebraucht wird, wurde die Expression von Prp1p reprimiert. Auch die Repression von Prp1p zieht keine Veränderung des Sedimentationsverhaltens der prä-katalytischen Spleißosomen nach sich, aber bei dieser Bedingung bleibt die Menge von Prp31p, das an spleißosomale Komplexe gebunden vorliegt, konstant bis die physiologische Integrität der Zellen verloren geht (S. 28 Abb. 3.18 und S. 30 Abb. 3.20). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen eindeutig, dass Prp1p für den Aufbau prä-katalytischer Spleißosomen nicht gebraucht wird. In Säugerzellen führt die Repression von U5-102K (Prp1p) durch RNAi zu einer Akkumulation von snRNP U5 und snRNP U4/U6, was mit der Abnahme des tri-snRNP Moleküls U4/U6.U5 korreliert [Schaffert *et al.*, 2004]. Diese Ergebnisse weisen auf einen wesentlichen Unterschied zwischen Mammalia und der Spalthefe beim Aufbau von Spleißosomen hin. Während Prp1p in Mammalia zum Aufbau und zum Zusammenhalt des tri-snRNP Komplexes U4/U6.U5 notwendig ist, hat Prp1p in der Spalthefe keine Funktion beim Aufbau von prä-katalytischen Spleißosomen und assoziiert mit tetra-

und penta-snRNP Molekülen. In Zellextrakt von *S. pombe* befinden sich keine signifikanten Mengen von tri-snRNP Molekülen [Huang *et al.*, 2002].

Die Mutationsanalysen im N-Terminus von Prp1p ergaben, dass die strukturelle Integrität des N-Terminus essentiell für die Funktion von Prp1p ist, aber für die Assoziation mit den prä-katalytischen Spleißosomen keine wesentliche Rolle spielt (S. 33 Abb. 3.22 und S. 34 Abb. 3.23).

Im N-Terminus wurde eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle von Prp4p-Kinase identifiziert, die in allen bekannten Prp1p Homologen (Ausnahme: *S. cerevisiae*) hoch konserviert ist. Obwohl es nicht gelang die zweite Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, um dann die Folgen einer Doppelmutation zu untersuchen, zeigen die Mutationsanalysen, dass Prp1p von Prp4p-Kinase phosphoryliert wird, wenn Prp1p an die prä-katalytischen Spleißosomen gebunden ist. Das ist ein überzeugender Hinweis, dass die Phosphorylierung von Prp1p an prä-katalytischen Spleißosomen bei der Aktivierung des Spleißprozesses eine Rolle spielt.

Im Folgenden wird auf der Grundlage bisheriger und der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ein Modell zur Aktivierung von Spleißosomen vorgeschlagen (Abb. 4.1).

Die 50S tetra-snRNP Komplexe (U2.U5.U4/U6) stellen in der Zelle den Pool prä-katalytischer Spleißosomen dar, der wie ribosomale Untereinheiten konstitutiv produziert und im Gleichgewicht gehalten wird [Raska *et al.*, 2004]. Das gleiche trifft zu für die 40S U1 snRNP Partikel (siehe Einleitung).

In *S. pombe* besitzen 43% der Gene ein oder mehrere Introns. Alternatives Spleißen von Genen wurde bisher nicht beobachtet. Das Spleißen von Introns ist in der Spalthefe im Rahmen der Genexpression ein konstitutiver Prozess [Kuhn und Käufer 2002; Kuhn und Käufer 2003]. Viele Beobachtungen weisen darauf hin, dass Introns während der Transkription gespleißt werden [Maniatis und Reed 2002; Kameoka *et al.*, 2004; Grainer und Beggs 2005]. Deshalb müssen Introns in der entstehenden prä-mRNA erkannt werden. Möglicherweise übernimmt snRNP U1 diese Funktion und erkennt und markiert Introns in den entstehenden prä-mRNAs. Die Phosphorylierung von Prp1p könnte dann bewirken, dass sich der tetra-snRNP Komplex mit U1 zu einem spleißkompetenten penta-snRNP verbindet, wobei die Phosphorylierung von Prp1p die Rekrutierung von Proteinen an das Spleißosom zur Folge hat, die die Entwindung von U4/U6 durch die Helikase Brr2 initiieren (Fig. 4.1 und Einleitung S. 4 Abb. 2.1) [Bottner *et al.*, 2005]. Tatsächlich ist das Vorhandensein eines sogenannten Prp19p Komplexes am Spleißosom eine

notwendige Voraussetzung für ein Spleißereignis *in vitro* [Chen *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003]. Der Prp19p Komplex enthält 9 Proteine wozu auch der Spleißfaktor Cdc5p gehört. Cdc5p wurde in *S. pombe* nicht an prä-katalytischen snRNP Komplexen gefunden, sondern liegt in Zellextrakt in großen Mengen in einem spleißosomalen Komplex mit den snRNPs U2.U6.U5 vor, der als (post)-katalytischer Komplex bezeichnet werden könnte (S. 16 Abb. 3.5; siehe Einleitung) [Ohi *et al.*, 2002]. In dem hier vorgeschlagenen Modell wird nicht ausgeschlossen, dass die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p-Kinase einhergeht mit der Phosphorylierung von weiteren spleißosomalen Komponenten, z.B. des Prp19p Komplexes, und dass diese konzertierte Aktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Umlagerung der snRNPs zu einem aktivierten Spleißosom *in vivo* darstellt, wobei Prp1p und Prp31p degradiert werden (Abb. 4.1). Diese Überlegungen sind in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit diskutierten Ergebnissen. Sowohl in spleiß-aktiven, als auch in spleißinaktiven Zellen werden penta-snRNP Komplexe in relativ geringen Mengen gefunden und *in vivo* ist phosphoryliertes Prp1p nur sehr schwer nachzuweisen [Schwelnus *et al.*, 2001].

Im Verlauf der Arbeit wurden auf den ersten Blick zwei sehr überraschende Beobachtungen gemacht. Prp1p akkumuliert bei 36°C, wobei ein Teil der Prp1p Moleküle nicht mit prä-katalytischen Spleißosomen assoziiert, sondern als snRNA freie Komplexe vorliegen (S. 20 Abb. 3.9). Die Akkumulation von Prp1p scheint im Rahmen einer milden Hitzeschockantwort der Zelle auf einer post-transkriptionalen Ebene zu erfolgen, da die Transkriptionsrate von *prp1*<sup>+</sup> bei 36°C nicht wesentlich beeinflusst wird [Chen *et al.*, 2003]. Ob und welche Rolle diese spezifische Hitzeschockantwort von Prp1p bei der Regulation des Spleißprozesses spielt, konnte nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die zweite, zunächst überraschende Beobachtung, führte zu der Schlussfolgerung, dass die Menge von Prp1p in der Zelle offensichtlich auch einem Kontrollmechanismus unterliegt, der nicht von der Temperatur abhängig ist. Die Repression des *prp1*<sup>+</sup> Allels, welches unter der Kontrolle des Thiaminpromotors steht, korreliert mit der Abnahme von HA-Prp1p, während die gleichzeitige konstitutive Expression des anderen *prp1*<sup>+</sup> Allels zu einer Zunahme von Myc-Prp1p in der Zelle führt (S. 39 Abb. 3.26). Die Zunahme der Menge von Prp1p wird auf einer post-transkriptionalen Ebene kontrolliert, da keine verstärkte Transkription zu beobachten war (Ergebnisse

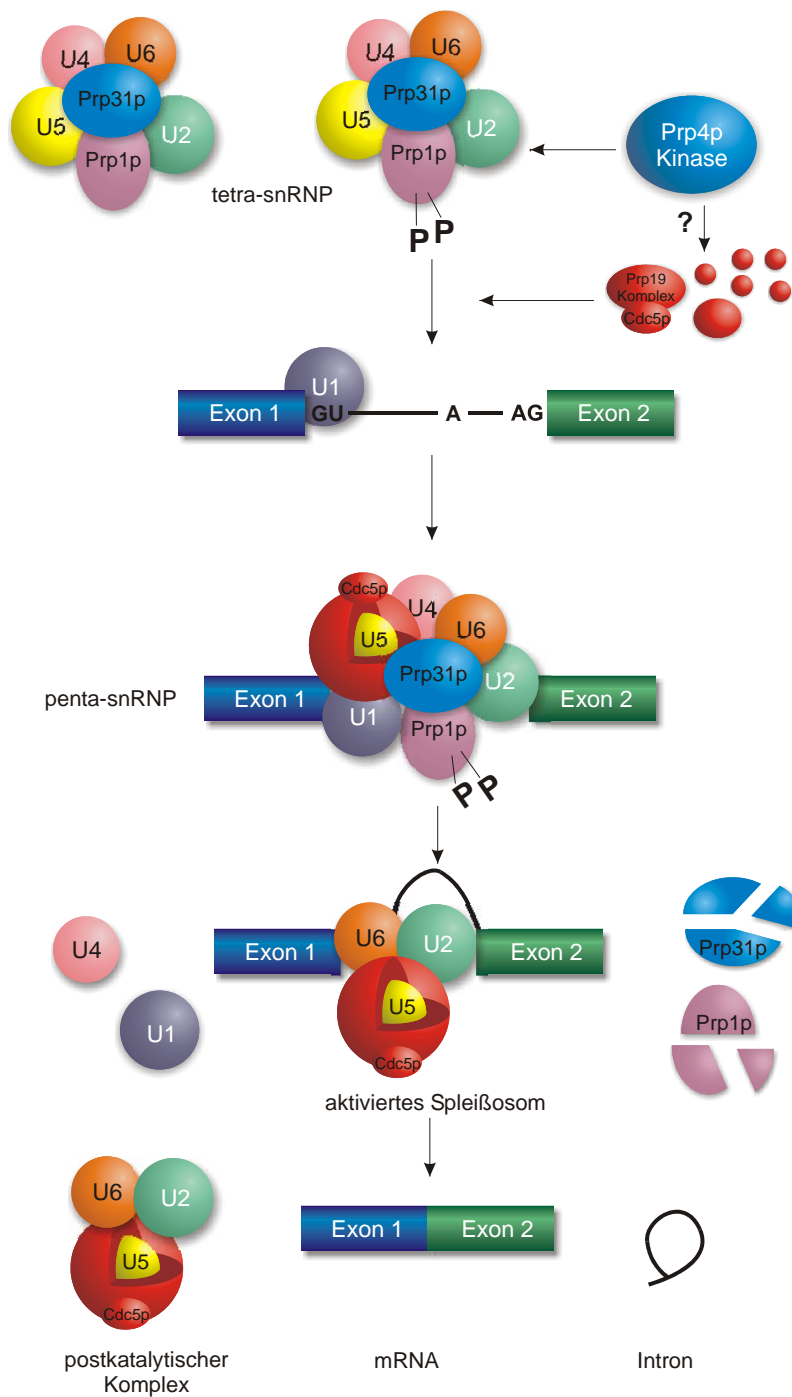


nicht gezeigt). In diesem Fall assoziieren alle Prp1p Moleküle ausschließlich mit prä-katalytischen Partikeln.

In vorherigen Arbeiten wurde eine funktionelle Verbindung von Prp1p und Prp4p-Kinase zum Zellzyklus beobachtet. Sowohl die temperatursensitiven (ts) Allele von *prp1* als auch ein ts Allel von *prp4* verursachen bei der restriktiven Temperatur (36°C) einen spezifischen Zellzyklusarrest, wobei ein Teil der Zellpopulation in der G1 Phase, ein anderer Teil der Zellpopulation in der G2 Phase arretiert [Schwelnus *et al.*, 2001]. In diesem Zusammenhang wurde eine Oszillation der Menge von Prp1p im Zellzyklus festgestellt, wobei die Maxima in der G1 und der G2 Phase erreicht werden [Richert, 2002 und Ergebnisse nicht gezeigt]. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Menge von Prp1p zellzyklusabhängig reguliert wird.

Die Deletion des gesamten N-Terminus ( $\Delta$ NGPrp1p) führt zum Verlust dieser Regulation und die Menge von  $\Delta$ NGPrp1p bleibt konstant (S. 36 Abb. 3.25 B). Hier ist darauf hinzuweisen, dass in diesem Versuchsansatz die Zellkulturen nicht synchron wachsen und deshalb keine Oszillation von Prp1p, sondern eine Zunahme zu beobachten ist (S. 39 Abb. 3.26). Es konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p-Kinase direkt oder indirekt oder überhaupt eine Rolle bei dieser Stabilisierung und Destabilisierung von Prp1p spielt. Bisher wurden keine weiteren spleißosomalen Proteine entdeckt, deren Menge im Zellzyklus oszilliert. Auch die Menge der Prp4p-Kinase bleibt im Zellzyklus konstant [Richert *et al.*, MGG 2002].

Obwohl sehr spekulativ, erlauben diese Ergebnisse eine Arbeitshypothese aufzustellen, die das vorgeschlagene Modell zur Aktivierung von Spleißosomen erweitert und dabei die Regulation des Spleißprozesses mit dem Zellzyklus koordiniert. Dafür wird postuliert, dass die Aktivierung eines Spleißosoms nicht nur durch die Phosphorylierung von Prp1p durch Prp4p-Kinase initiiert wird, sondern dass die Prp1p Moleküle als Oligomere an der Aktivierung beteiligt sind. Die Zunahme von Prp1p würde dann ermöglichen mehr tetra-snRNP und U1 Komplexe aus dem vorhandenen Pool zu aktivieren. Diese Hypothese macht die Voraussage, dass in der G1 und der G2 Phase im Zellzyklus die Spleißaktivität am höchsten ist. Tatsächlich werden viele essentielle Gene zellzyklusabhängig transkribiert, wobei in der G1 und in der G2 Phase die höchste Transkriptionsrate festgestellt wird [Rustici *et al.*, 2004].



**Abb. 4.1** Modell zur Aktivierung von Spleißosomen. Erläuterungen siehe Text.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte

**Tab. 5.1** Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Blockthermostat BT100	Kleinfeldt Labortechnik
FastPrep FP120	Savant
Gelkammer für Agarosegele	Gibco BRL
Gelkammer für Proteingele	Phase
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Laborzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Mikroskop	Zeiss
Rotoren: SS34, GS-3	Sorvall
Rotor SW41	Beckman
SpeedVac plus SC11A	Savant
Spektralphotometer DU-530	Beckman
Thermocycler	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischzentrifuge fresco	Heraeus
Ultrazentrifuge L8-70	Beckman

### 5.2 Chemikalien

**Tab. 5.2** Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ameisensäure 85% p. a.	Roth
$\gamma$ [ <sup>32</sup> P] ATP, 370 MBq/mL	Hartmann Analytic
$\alpha$ [ <sup>32</sup> P] dCTP, 370 MBq/mL	Hartmann Analytic
Aceton p. a.	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (40%/0,8%)	Roth
Adenin	Roth
Agar	Gibco BRL
Agarose	Biomol
Ampicillin Natriumsalz 99%	Sigma
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
Biotin	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovine serum albumin)	BioMol
n-Butanol p. a.	Roth

**Tab. 5.2** Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalien	Hersteller
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid-Dihydrat)	Merck
Calciumpantothenat	Merck
Chloroform p. a.	Roth
Coomassie Brilliant blue G250	Merck
Chymotrypsin	Sigma
Dextranblau	Sigma
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech
DNase	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth
EGTA (Ethylenglykol-bis-tetraessigsäure) p.a.	Roth
Essigsäure 100% p. a.	Roth
Ethidiumbromid	Biomol
Ethanol	Chemikalienlager TU/BS
Formaldehyd 37%	Roth
Formamid p. a.	Roth
β-Glycerophosphat	Sigma
Glycerin >95,5%, p. a., wasserfrei	Roth
Hefe-Extrakt	Gibco BRL
HEPES	Sigma
Heringsperma DNA	Sigma
L-Histidin	Roth
Imidazol	Roth
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) 99%	Roth
Isopropanol p. a.	Roth
Kalbsthymus DNA	Sigma
Kaliumacetat p. a.	Roth
KCl (Kaliumchlorid) p.a.	Roth
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Kaliumhydrogenphosphat) >98%	Roth
KOH (Kaliumhydroxid) 85% p. a.	Roth
L-Leucin	Roth
LiOAc (Lithiumacetat) 99%	Roth
LiCl (Lithiumchlorid)	Sigma
L-Lysin	Merck
Lysozym	Biomol
MnCl <sub>2</sub> (Mangan(II)-chlorid)	Sigma
Magermilch	Difco

**Tab. 5.2** Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalien	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Biomol
MOPS	Sigma
NaAc (Natriumacetat) p. a., wasserfrei	Roth
$\text{NaN}_3$ (Natriumazid) p. a.	Merck
NaCl (Natriumchlorid) p. a.	Roth
NaF (Natriumfluorid) p. a.	Merck
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat) p. a.	Roth
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	Roth
$\text{NaVO}_3$ (Natriummonovanadat)	Merck
Nicotinsäure 99,5%	Roth
Nucleobond Plasmid Midi Kit	Machery & Nagel
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll
NP40	Sigma
Nylonmembran	Schleicher & Schüll
PEG (Polyethylenglycole) 3500	Sigma
Pepton 140	Gibco BRL
Proteinase K; RNase-frei	Sigma
ProteinA-Sepharose	Sigma
PCIA (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)(50:48:2)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Proteolyseinhibitor Biostab	BIOMOL
Pyridin	Sigma
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN
RNase A	Sigma
RbCl Rubidiumchlorid p. a.	Sigma
Saccharose	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat) >99% p. a.	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) p. a.	Roth
Tri-Natriumcitrat	Roth
Tris	Roth
Tris-Borat	Sigma
Thiamin	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Roth
Uracil	Sigma

### 5.3 Kulturmedien

Für die Kultivierung von *S. pombe* wurden die folgenden Medien in der von Egel [1971], Gutz *et al.* [1974] und Moreno *et al.* [1991] beschriebenen Zusammensetzung verwendet.

EMM Edinburgh minimal medium; als festes und flüssiges Medium

YEA yeast extract agar

YEL yeast extract liquid

MEA Malt extract agar

SPA Medium zur Kreuzung

Die Kultivierung auxotropher Stämme erfolgte in Minimal-Medium, dem je nach Bedarf 75 mg/L Adenin, 100 mg/L L-Histidin, 150 mg/L L-Leucin, 50 mg/L L-Lysin oder 100 mg/L Uracil zugesetzt wurde. Zur Repression der Thiaminpromotoren wurde dem Minimalmedium 0,1 mM Thiamin zugefügt.

*E. coli* wurde in LB (Luria-Bertani) Medium kultiviert [Sambrook *et al.*, 2001]. Zur Selektion von Ampicillin-resistenten Stämmen wurde dem Medium 40 mg/L Ampicillin zugefügt. Zur Selektion von Kanamycin-resistenten Stämmen wurde dem Medium 25 mg/L Kanamycin zugefügt.

### 5.4 Stämme

#### 5.4.1 Verwendete *S. pombe* Stämme

Alle für die Untersuchungen verwendeten *S. pombe* Stämme sind in Tabelle 5.3 aufgelistet. Die Stämme leiten sich von den von Leupold [1950] beschriebenen Kulturen ab. Sie wurden entweder im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (mit \* markiert) oder der Stammsammlung des Instituts für Genetik der TU Braunschweig entnommen. Der Paarungstyp ( $h^{-S}$ ,  $h^{+N}$ ) und die durch die Allelbezeichnung gekennzeichneten Mutationen sind angegeben. Genunterbrechungen sind durch :: gekennzeichnet. Die Integration von Vektoren in ein Hefegen wird durch ::int beschrieben.

**Tab 5.3** *S. pombe* Stämme. Die in dieser Arbeit hergestellten Stämme sind mit einem \* markiert.

Stamm	Genotyp
L972	<i>h<sup>S</sup></i>
SL115	<i>h<sup>S</sup> leu1-32 ura4-294 his7-366</i>
288	<i>h<sup>S</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> leu1-32 ura4-294</i>
337	<i>h<sup>S</sup> HA-prp4<sup>+</sup> leu1-32 ura4-294</i>
380*	<i>h<sup>+N</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-cdc5<sup>+</sup></i>
407*	<i>h<sup>S</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> prp4-73<sup>ts</sup> leu1-32 ura4-D18</i>
425*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4-294</i>
453*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-ΔNprp1</i>
470*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1<sup>+</sup></i>
491*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ78-107</i>
493*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ126-161</i>
495*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ170-208</i>
497*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ227-249</i>
499*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ1-41</i>
503*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1Δ25-56</i>
509*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1 (T26/29/30A)</i>
514*	<i>h<sup>S</sup> leu1::int nmt81HA-prp1<sup>+</sup> his7-366 ura4-294</i>
522*	<i>h<sup>S</sup> leu1::int nmt81HA-prp1<sup>+</sup> prp1::his7<sup>+</sup> ura4-294</i>
523*	<i>h<sup>S</sup> leu1::int nmt81HA-prp1<sup>+</sup> prp1::his7<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1<sup>+</sup></i>
525*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1 (T26/29/30/197/199/205/207/232/236/244A)</i>
527*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1 (T244A)</i>
537*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1 (T197/199A/205/207)</i>
540*	<i>h<sup>S</sup> prp1::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup> ura4::int Myc-prp1 (T232/236/244)</i>
AK030	<i>h<sup>+N</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup></i>

**Tab 5.3** *S. pombe* Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Genotyp
AK038	$h^{+N}$ <i>prp4::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp4<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup></i>
AK042	$h^{+N}$ <i>HA-prp31<sup>+</sup> ura4-D18 ade6-M210</i>
AK054	$h^{+N}$ <i>prp4::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp4<sup>+</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-prp31<sup>+</sup></i>
AK057	$h^{+N}$ <i>prp4::his7<sup>+</sup> leu1::int nmt81prp4<sup>+</sup> Myc-prp1<sup>+</sup> HA-cdc5<sup>+</sup></i>
KGY792	$h^{+N}$ <i>HA-cdc5<sup>+</sup></i>

#### 5.4.2 Verwendete *E. coli* Stämme

Für die Transformation und Vermehrung von Plamid-DNA wurden die in Tab. 5.4 aufgeführten *E. coli* Stämme verwendet.

**Tab 5.4** *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha^{TM}$	$F^- \phi 80dlacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-argF) \Delta lacU196 deoR recA1 endA1$ $hsdR17(rK^-, mK^+) supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$
XL1-Blue	$hsdR17(rK^-, mK^+) endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 \lambda^- lac$ $F' [proAB^+ lacI^q lacZ\Delta M15 Tn10(tet^r)]$
M15	$Nal^S Str^S rif^S lac^- ara^- gal^- mtf^- F^- recA^+ uvr$

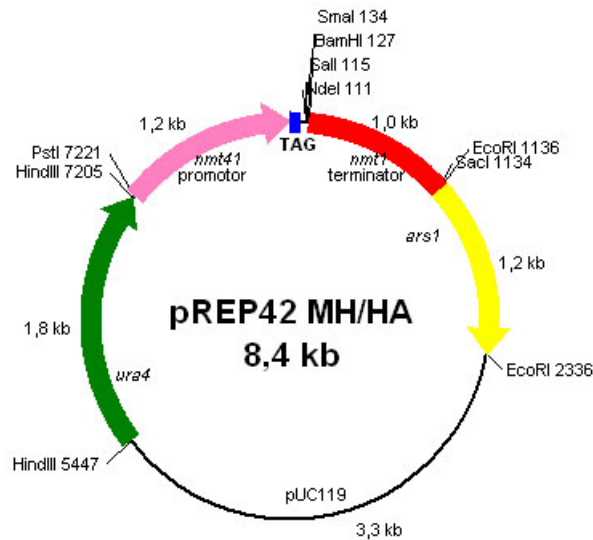
### 5.5 Vektoren

#### 5.5.1 pREP42MH / pREP42HA

Die Vektoren pREP42MH und pREP42HA (Abb. 5.1) sind Shuttlevektoren für *S. pombe*, die zur Expression N-terminaler Fusionsproteine verwendet werden. Die exprimierten Proteine enthalten vor dem Startcodon sechs Histidinreste und zwei Kopien des *c-Myc*-Epitops (pREP42MH) bzw. drei Kopien des HA-Epitops (pREP42HA). Die Vektoren enthalten den durch Thiamin reprimierbaren *nmt41* Promotor [Craven *et al.*, 1998], in dem 4 Nukleotide der TATA Box deletiert wurden. Hieraus resultiert eine geringere Transkriptionseffizienz im Vergleich zum *nmt1<sup>+</sup>* Promotor des Wildtyp [Basi *et al.*, 1993]. Weitere Elemente der Vektoren sind der *nmt1* Terminator, das *ars1* Element zur Replikation und das *ura4<sup>+</sup>* Gen zur Selektion in *S. pombe*. Durch die Deletion des *ars1* Elements (*EcoRI* Fragment), entstehen Integrationsvektoren, die durch homologe Rekombination in den *ura4* Locus von *S. pombe* integriert werden können [Bähler *et al.*, 1998]. In der pUC119 Sequenz sind



der ColE1 Origin und das  $\beta$ -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz) enthalten, wodurch eine Vermehrung und Selektion in *E. coli* ermöglicht wird [Craven *et al.*, 1998].



#### his/Myc Epitop

ATG GGT AGC AGC CAC CAT CAT CAC CAT CAT GCT GAG GAG CAA AAG TTA ATT TCT GAA GAA GAT TTG TCC ATG GCT GAA GAA  
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Met Ala Glu Glu

CAA AAA TTG ATC AGC GAG GAG GAC TTA CAT ATG

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His Met

#### HA Epitop

ATG GCA TAC CCT TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCC ATG GGC TAC CCT TAC GAC

Met Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Mte Gly Tyr Pro Tyr Asp

GTT CCA GAT TAC GCT CAT ATG TCG ACT CTA GAG GAT

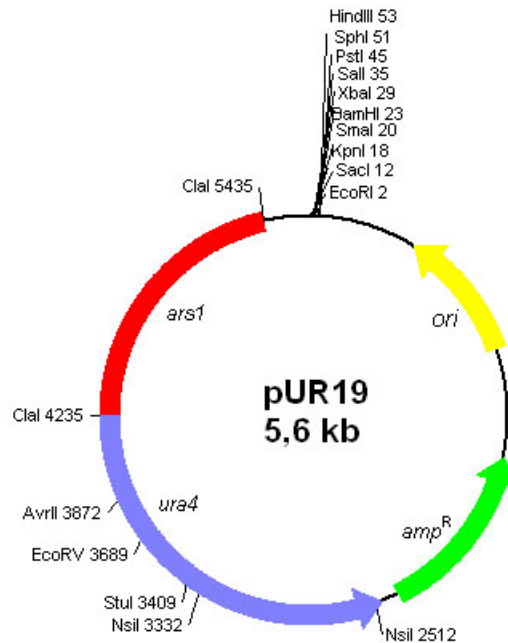
Val Pro Asp Tyr Ala His Met Ser Thr Leu Glu Asp

**Abb. 5.1** pREP42 MH und pREP42 HA Expressionsvektoren für *S. pombe*. Elemente der Vektoren sind das *ura4<sup>+</sup>* Gen, das *ars1* Element, der *nmt1* Promotor (*nmt41*) und der *nmt1* Terminator aus *S. pombe*. pUC119, Teile des *E. coli* Vektors pUC119; TAG, 6 x His und 2 x *c-Myc*-Epitop (pREP42 MH) bzw. 3 x *HA*-Epitop (pREP42 HA) Sequenz [Craven *et al.*, 1998].

#### 5.5.2 pUR19 / pUR19 $\Delta$ ars

Für die Integration der *Myc-prp1*-Mutantenallele in den *ura4* Locus von *S. pombe* wurde der Shuttlevektor pUR19 $\Delta$ ars verwendet [Barbet *et al.*, 1992]. Er enthält das *ura4<sup>+</sup>* Gen von *S. pombe*. Wird das *ars1* Element an den *Clal* Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor pUR19 (Abb. 5.2) entfernt, ist keine autonome Replikation des Plasmids in *S. pombe* mehr möglich. Die *Myc-prp1*-Konstrukte wurden mit *AvrII* linearisiert und über homologe Rekombination in den *ura4-294* Locus des *S. pombe*

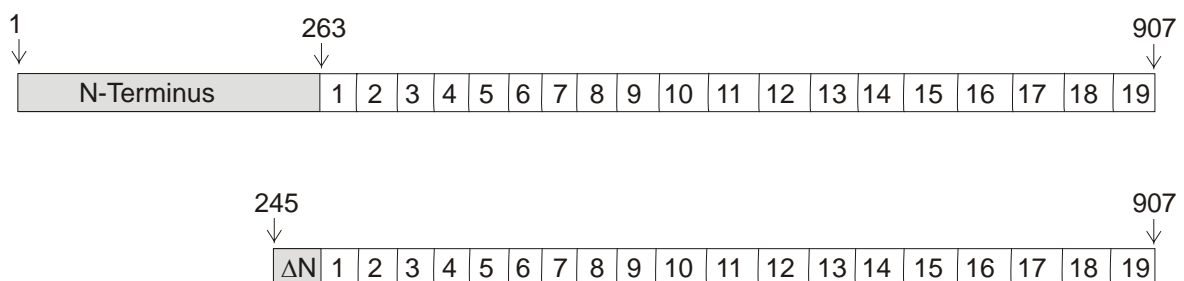
Genoms integriert. Beide Vektoren verfügen über den Replikationsursprung (ori) zur Vermehrung der Plasmide in *E. coli* und das Ampicillingen ( $amp^R$ ) zur Selektion auf Transformanten in *E. coli*.



**Abb. 5.2** Genkarte des Klonierungsvektors pUR19. Der Vektor enthält das  $ura4^+$  Gen und das  $ars1$  Element von *S. pombe*. Zur Selektion in *E. coli* dient das Ampicillingen ( $amp^R$ ) und zur Replikation der origin of replication (ori) [Barbet *et al.*, 1992].

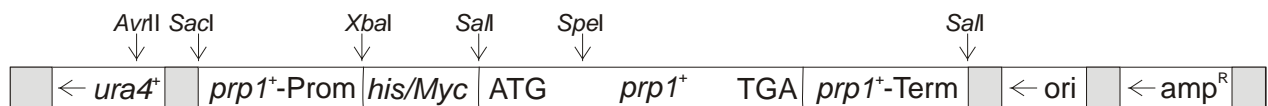
### Konstruktion von pUR19 $\Delta$ ars Myc- $\Delta$ Nprp1

Zur Untersuchung, ob der N-Terminus von Prp1p für den Aufbau oder die Aktivierung spleißosomaler Komplexe essentiell ist, wurden die Aminosäuren 1 bis 244 deletiert (Abb. 5. 3).



**Abb. 5.3** Schematische Darstellung der Deletion von Prp1p. Die Aminosäuren 1 bis 244 im N-Terminus (grau unterlegt) wurden entfernt. 1-19: Tetratricopeptide-repeats.

Als Ausgangskonstrukt diente pUR19 $\Delta$ ars Myc-*prp1*<sup>+</sup> (Abb. 5.4), das 900 bp des *prp1*<sup>+</sup> Promotorbereichs (GenBank acc. no. AB019219) enthält, der in die *SacI* und *XbaI* Schnittstelle von pUR19 $\Delta$ ars (Abb. 5.2) kloniert ist. Das his/Myc Epitop aus dem Vektor pREP42MH (Abb. 5.1) wurde mittels PCR amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, dass 5' eine *XbaI* und 3' eine *SalI* Restriktionsschnittstelle entstand. Das PCR Fragment wurde nach Restriktion mit *XbaI* und *SalI* in das obige Konstrukt kloniert. Das offene Leseraster von *prp1*<sup>+</sup> (GenBank acc. no. AB019219) bis zu einer natürlichen *SalI* Schnittstelle 680 bp hinter dem Stopp Codon wurde aus genomischer DNA von *S. pombe* mittels PCR amplifiziert. Mit dem 5' Primer wurde eine *SalI* Schnittstelle eingefügt. Die Amplifikate wurden mit *SalI* geschnitten und in das beschriebene Konstrukt kloniert (Konstruktssammlung Arbeitsgruppe Käufer, genetisches Institut; Braunschweig).



**Abb. 5.4** Schematische Darstellung des pUR19 $\Delta$ ars Myc-*prp1*<sup>+</sup> Konstruktes. Prom, Promotor-; Term, Terminatorsequenz des *prp1*<sup>+</sup> Gens aus *S. pombe*.

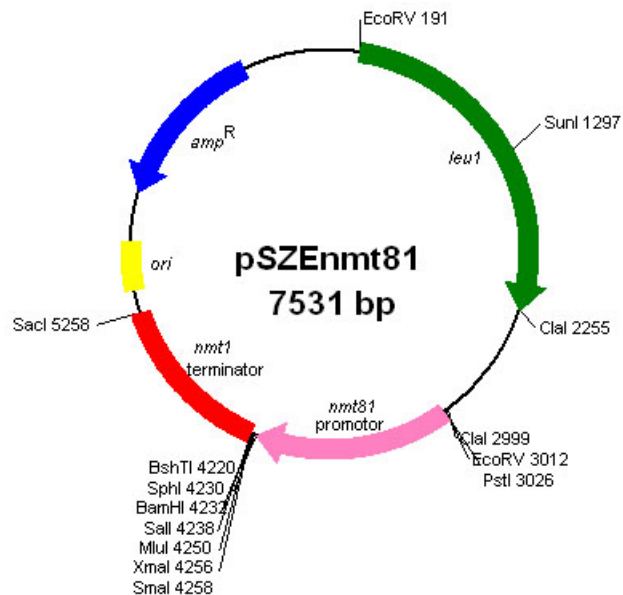
Für die Herstellung von pUR19 $\Delta$ ars Myc- $\Delta$ N*prp1* wurde das in Abbildung 5.4 dargestellte Konstrukt mit *XbaI* und *SpeI* geschnitten, wodurch das his/Myc Epitop (114 bp) und 729 bp vom N-Terminus des *prp1*<sup>+</sup> Gens entfernt wurden. Mittels PCR wurde das his/Myc Epitop aus pUR19 $\Delta$ ars Myc-*prp1*<sup>+</sup> amplifiziert und mit dem 3' Primer (Tab. 5.5) eine *SpeI* Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Amplifikate wurden mit *XbaI* und *SpeI* geschnitten und in das mit den gleichen Enzymen linearisierte Konstrukt pUR19 $\Delta$ ars Myc-*prp1*<sup>+</sup> (Abb. 5. 4) kloniert. Mit *AvrII* wurde pUR19 $\Delta$ ars Myc- $\Delta$ N*prp1* im *ura4*<sup>+</sup> Gen linearisiert und über homologe Rekombination in den *ura4* Locus des Stammes 425 (Tab. 5.3) integriert.

**Tab. 5.5** PCR Primer für die Isolierung des his/Myc Epitops aus pUR19 $\Delta$ ars Myc-*prp1*<sup>+</sup>

Bezeichnung	Sequenz
CAB018	5' GTA <u>GTC TAG AAT</u> GGG TAG CAG CC 3' <i>XbaI</i>
CAB019	5' CTA <u>GAC TAG TCA</u> TAT GTA AGT CCT CCT CGC 3' <i>SpeI</i>

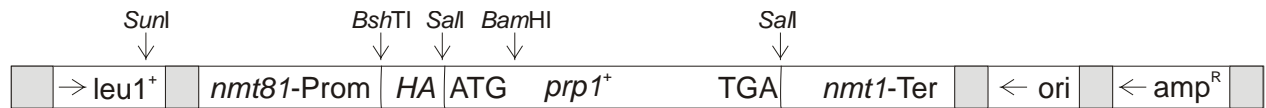
### 5.5.3 pSZE<sub>nmt81</sub>

Für die Integration in den *leu1* Locus von *S. pombe* wurde der Shuttlevektor pSZE<sub>nmt81</sub> (Abb. 5.5) verwendet [Zock-Emmenthal, TU Braunschweig]. Der Vektor enthält das *leu1*<sup>+</sup> Gen von *S. pombe*. Er besitzt den um 7 Nukleotide in der TATA Box deletierten *nmt81* Promotor und den *nmt1* Terminator aus *S. pombe*. Die Deletion reduziert die Transkriptionsrate des Promotors auf ca. 1% der des Wildtyp *nmt1*<sup>+</sup> Promotors [Basi *et al.*, 1993]. Für die Selektion in *E. coli* enthält der Vektor das Ampicillin-Resistenzgen, einen Replikationsursprung (ColE1 ori) und das *lacZ'* Gen von *E. coli*, das in einem geeigneten *E. coli* Stamm die Blau/Weiß Selektion ( $\alpha$ -Komplementierung) ermöglicht.



**Abb. 5.5** Genkarte des Integrationsvektors pSZE<sub>nmt81</sub>. Der Vektor enthält das *leu1*<sup>+</sup> Gen, den *nmt81* Promotor und den *nmt1* Terminator aus *S. pombe*. Zur Selektion in *E. coli* dient das Ampicillingen (*amp*<sup>R</sup>) und zur Replikation der origin of replication (*ori*).

### Konstruktion von pSZE $nmt81HA-prp1^+$



**Abb. 5.6** Schematische Darstellung des Thiamin regulierbaren Konstruktes pSZE $nmt81HA-prp1^+$ .

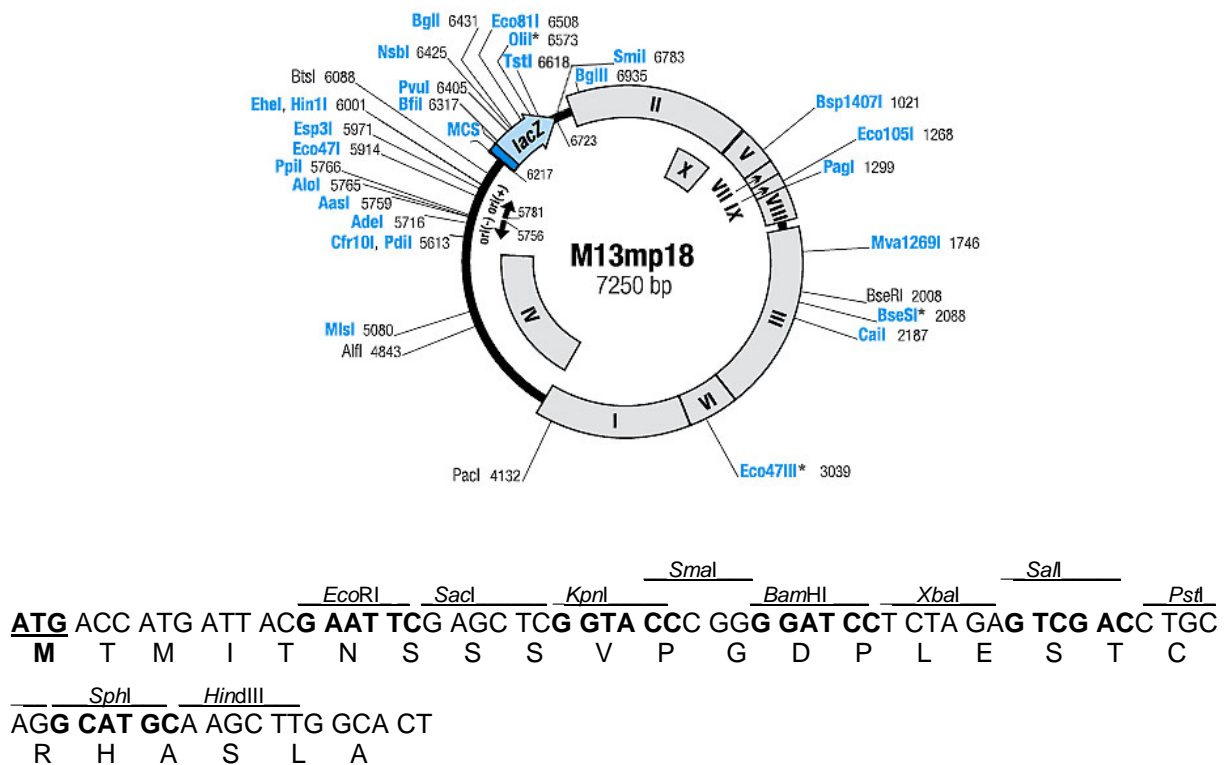
Zur Herstellung des Thiamin regulierbaren  $nmt81HA-prp1^+$  Konstruktes (Abb. 5. 6) wurde ein 2518 bp langes  $prp1^+$  Fragment über die natürliche *Bam*HI und die unmittelbar hinter dem Stopp Codon liegende *Sal*I Schnittstelle aus dem Konstrukt pQE31 $prp1^+$  geschnitten. Das  $prp1^+$  Gen ist in diesem Konstrukt in die *Sal*I Schnittstelle des Polylinkers von pQE31 (Abb. 5.8) kloniert [Schwelnus, persönliche Mitteilung]. Das Fragment wurde in den mit *Sal*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pSZE $nmt81$  (Abb. 5.5) kloniert (Konstrukt 1). Aus pRHA42 $prp1^+$  (Konstruktssammlung Arbeitsgruppe Käufer, genetisches Institut; TU Braunschweig) wurde das HA-Epitop und die noch fehlenden 203 Nukleotide der N-terminalen  $prp1^+$  Sequenz mittels PCR amplifiziert. Mit dem 5' Primer wurde eine *Bsh*TI Schnittstelle eingefügt, der 3' Primer wurde down stream der *Bam*HI Schnittstelle gewählt (Tab. 5.6). Das PCR Fragment und Konstrukt 1 wurden mit *Bam*HI und *Bsh*TI geschnitten und anschließend ligiert. Das erhaltene Konstrukt pSZE $nmt81HA-prp1^+$  wurde mit *Sun*I im Leucin Gen linearisiert und in den *leu1* Locus von *S. pombe* (Stamm SL115) integriert.

**Tab. 5.6** PCR Primer für die Isolierung des HA-Epitop aus dem Konstrukt pRHA42 $prp1^+$

Bezeichnung	Sequenz
HA-Tag <i>Bsh</i> TI	5' ATA <u>CCG GTA</u> TGG CAT ACC C 3' <i>Bs</i> HTI
KR30	5' TCA AGT TTG GCT AGC

### 5.5.4 M13mp18

Der M13mp18 Vektor ist ein Derivat des einzelsträngigen, filamentösen DNA Bakteriophagen M13. Die gewünschte DNA, wird in den Polylinker kloniert, der Teil eines klonierten und veränderten *lacZ'*-Gens in der doppelsträngigen, replikativen Form von M13 ist. Die Vektor DNA enthält den Promotor, die CAP Protein-Bindungsstelle und die Repressor-Bindungsstelle aus dem *lac* Operon von *E. coli*, sowie die Phagengene I-X. Die Vorteile des M13-Systems liegen darin, dass zum einen die doppelsträngige zirkuläre DNA (replikative Form) aus *E. coli* isoliert und wie ein Plasmid behandelt werden kann, zum anderen kann die einzelsträngige, virale DNA (+ Strang) aus den Phagenpartikeln im Kulturmedium isoliert werden.



**Abb. 5.7** Vektorkarte und Polylinker (MCS) von M13mp18 [Fermentas].

### Konstrukt für die Mutagenese von *prp1*<sup>+</sup>

Das *prp1*<sup>+</sup>-Gen (GenBank acc. no. AB019219) wurde mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Mit den Primern (Tabelle 5.7) wurde am 3' und 5' Ende eine *SalI* Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das Amplifikat wurde mit *SalI* geschnitten und in den Polylinker des Vektors M13mp18 kloniert [Schwelnus, persönliche Mitteilung].

**Tab. 5.7** PCR Primer für die Isolierung des *prp1*<sup>+</sup>-Gens aus genomischer DNA

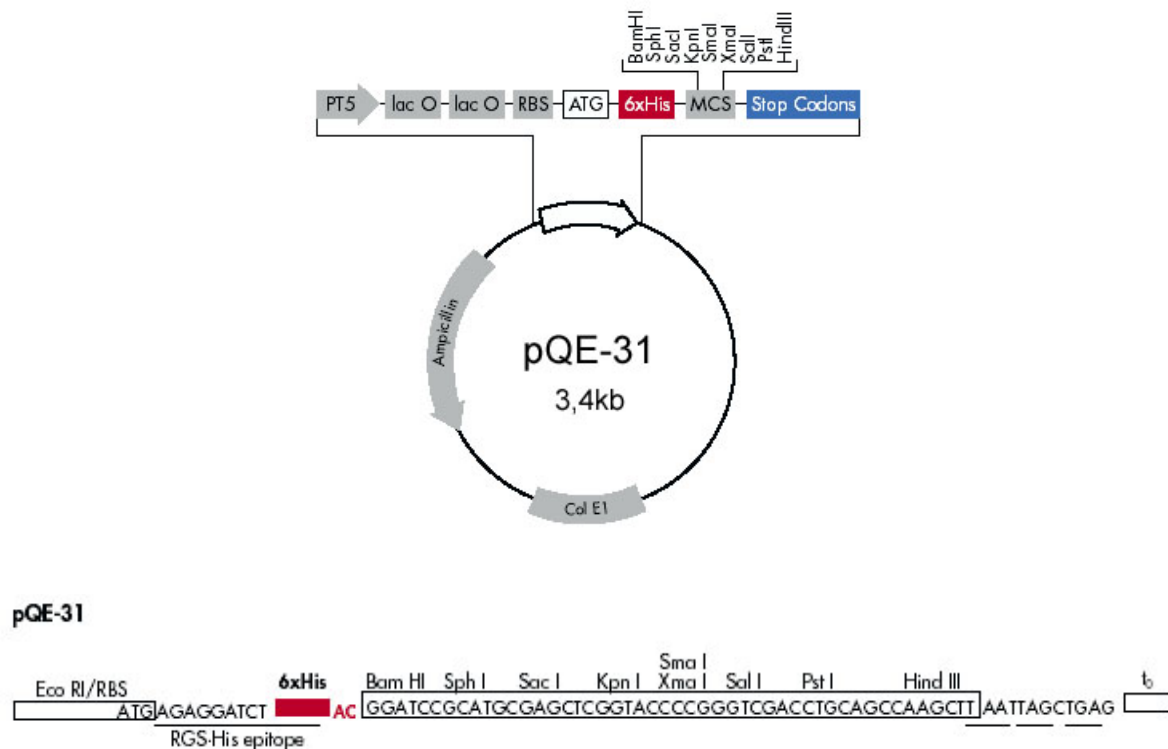
Bezeichnung	Sequenz
K133	5' ATA <u>TGT CGA CCA</u> TGG CAA ACT TTT ATC CAG AT 3' <i>Sall</i>
K134	5' ATA <u>TGT CGA CTC</u> ATA ACA CAT TTA TGG CAA GA 3' <i>Sall</i>

### 5.5.5 Der QIAexpressionist™

Das QIAexpress-System (QIAGEN) erlaubt die Fusion von Proteinen mit einer Domäne aus sechs Histidinresten. Das ermöglicht die affinitätschromatische Aufreinigung der Proteine. Die in dem System enthaltenen Vektoren pQE und pREP4 ermöglichen die regulierte Expression des Fusionsproteins.

Der pQE-Vektor gewährleistet eine hohe Proteinexpression. Er besitzt einen starken, regulierbaren Promotor, der sich aus dem Promotor des Phagen T5 und zwei *lac*-Operator-Sequenzen zusammensetzt. Der *t<sub>0</sub>*-Transkriptionsterminator stammt aus dem  $\lambda$ -Phagen. Dazwischen befindet sich eine synthetische Ribosomenbindungsstelle (RBS), die für eine hohe Translationsrate sorgt und eine für das His<sub>6</sub>-Epitop kodierende Sequenz. Um die Expression unterschiedlicher Leseraster zu ermöglichen, gibt es eine Serie von verschiedenen pQE-Vektoren. In jedem Leseraster befindet sich ein Stopp-Codon zur Beendigung der Translation. Das  $\beta$ -Lactamasegen, vermittelt Ampicillinresistenz. In dieser Arbeit wurde der Vektor pQE-31 verwendet (Abb. 5.8).

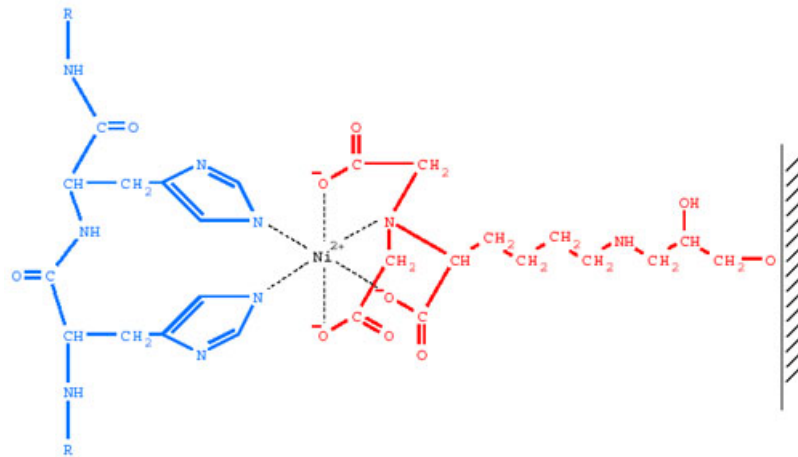
Der zweite Vektor des Plasmidsystems, pREP4, enthält das Kanamycinresistenz-Gen zur Selektion in *E. coli* und das *lacI*-Gen, welches für den *lac*-Repressor kodiert und konstitutiv exprimiert wird. Das *lac*-Repressorprotein reprimiert die Transkription des T5-Promotors auf dem pQE-Plasmid effizient. Die Expression des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. IPTG bindet an den *lac*-Repressor, was zu einer Konformationsänderung des Repressors führt, sodass dieser nicht mehr in der Lage ist an den Operator (*lacO*) zu binden.



**Abb. 5.8** Genkarte des pQE-31 Vektors und des Polylinkers (MCS). PT5, Promotor des Phagen T5; lac O, lac-Operator-Sequenz; RBS, synthetische Ribosomenbindungsstelle; 6xHis, Sequenz von 6 Histidinresten; ColE1, Replikationsursprung; Ampicillin, Ampicillinen; t<sub>0</sub>, Transkriptionsterminator des λ Phagen [QIAGEN].

Die Aufreinigung des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins erfolgt nach dem Prinzip der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC). Matrix (Agarose) gebundene Nitrilo-tri-Essigsäure (NTA) ist mit Nickelionen beladen. Ni-NTA Agarose komplexiert stabil mit dem His<sub>6</sub>-Epitop des Fusionsproteins (Abb. 5.9). Dadurch können verunreinigende Proteine unter sehr stringenten Bedingungen von der Matrix gewaschen werden, ohne die Bindung des Fusionsproteins zu beeinträchtigen. Es kann dadurch in nur einem Schritt von unter 1% auf über 95% aufgereinigt werden [Janknecht *et al.*, 1991]. Die Elution des gebundenen His<sub>6</sub>-Fusionsproteins kann entweder durch Senkung des pH-Wertes auf pH 4,5 oder durch Erhöhung der Imidazol- bzw. Histidinkonzentration erfolgen. Imidazol und Histidin haben eine ähnliche Struktur, so dass Imidazol Histidin von der Matrix verdrängen kann. Die Ni-NTA-Agarose hat eine Bindungskapazität von 5-10 mg Fusionsprotein/mL Agarose [QIAGEN].





**Abb. 5.9** Interaktionen zwischen dem His<sub>6</sub>-Epitop und der Ni-NTA-Agarose [QIAGEN].

### Konstrukte für die Expression von Prp1p in *E. coli*

Das *prp1*<sup>+</sup>-Gen (GenBank acc. no. AB019219) wurde mit *Sal*I aus dem Konstrukt M13mp18-*prp1*<sup>+</sup> (Abschnitt 5.5.4) geschnitten und in den Polylinker von pQE-31 kloniert [Schwelnus, persönliche Mitteilung].

Nach der Mutagenese von M13mp18-*prp1*<sup>+</sup> wurden die mutierten *prp1* Sequenzen an geeigneten Restriktionsschnittstellen aus dem M13mp18 Vektor in den pQE-31 Vektor kloniert.

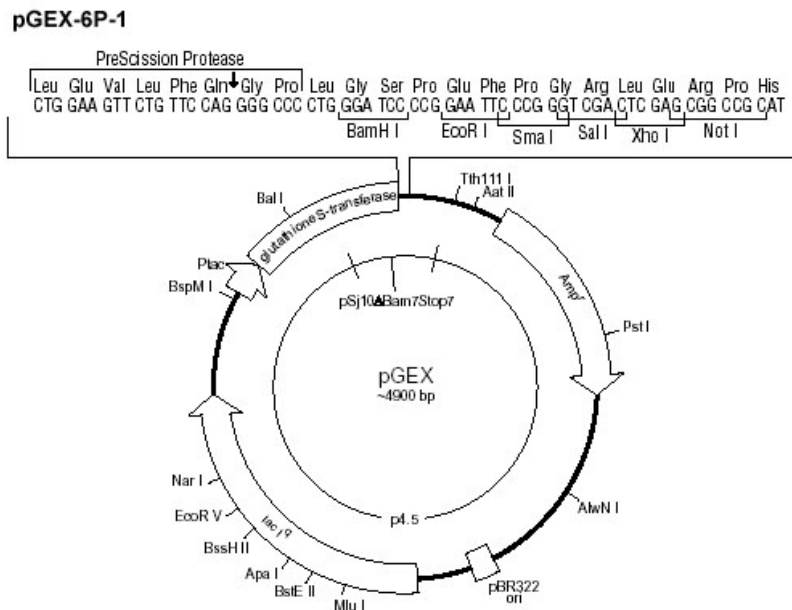
### 5.5.6 Das Glutathion-S-Transferase Expressionssystem

Das GST-Genfusionssystem der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE ermöglicht die Fusion eines klonierten Genes mit der 26 kD großen Glutathion S-Transferase-Domäne (GST-Domäne) aus *Schistosoma japonicum*. Die GST-Fusionsproteine können mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt werden.

Die pGEX-Vektoren (Abb. 5.10) sind ein Teil dieses Systems. Sie unterscheiden sich im Polylinker und besitzen den durch IPTG induzierbaren *lac*-Promotor und das *lac*<sup>f</sup>-Gen, das für den *lac*-Repressor kodiert. Zur Selektion in *E. coli* enthalten die Plasmide das Ampicillinresistenz-Gen. Vor den Polylinkern befinden sich die Erkennungssequenzen und Schnittstellen von Proteasen. Mit Hilfe der Protease kann das Protein direkt von der Glutathion Sepharose eluiert werden. Der GST-Rest verbleibt an der Matrix. Aus einem Liter Bakterinkultur lassen sich zwischen 1 und 10 mg Protein gewinnen.

Für die Expression der Prp4p-Kinase in *E. coli* wurde der Vektor pGEX-9P-1 verwendet, in dessen *Bam*HI Schnittstelle die *prp4*<sup>+</sup>-cDNA (GenBank acc. no.

L10739) kloniert worden war [Konstruktssammlung Arbeitsgruppe Käufer; TU Braunschweig].



**Abb. 5.10** Genkarte des pGEX-6P-1 Vektor. Amp<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; pBR322 ori, Replikationsursprung; *lacI<sup>q</sup>*, Gen für den *lac*-Repressor; Plac, *lac*-Promotor [AMERSHAM LIFE SCIENCE].

## 5.6 Konstruktion eines Stammes mit *nmt81HA-prp1<sup>+</sup>*- und *Myc-prp1<sup>+</sup>* Allel

Der Stamm 523 (Tab. 5.3) besitzt zwei *prp1<sup>+</sup>* Allele. Das eine Allel ist mit dem Myc-Epitop fusioniert und wird vom eigenen Promotor reguliert, das andere Allel ist mit dem HA-Epitop fusioniert und steht unter dem Thiamin regulierbaren *nmt81* Promotor.

Im ersten Schritt wurde das Konstrukt pSZE*nmt81HA-prp1<sup>+</sup>* (Abschnitt 5.5.3) mit *SunI* im *leu1<sup>+</sup>* Gen linearisiert und in den genomischen *leu1* Locus von Stamm SL115 (Tab. 5.3) integriert. Dazu wurde das *SunI* linearisierte Konstrukt in den Stamm SL115 transformiert und nach der Transformation auf Leucin prototrophe Klone selektiert. Die Integration in den *leu1* Locus wurde durch PCR und mittels Westernanalyse mit anti-HA Antikörpern überprüft. Ein Primer (OL82) für die PCR Reaktion ist komplementär zu einer genomischen Sequenz vor dem *leu1* Gen und der andere (OL83) zu Vektorsequenzen nach der *leu1* Sequenz des Vektors [Beckmann, 2000] (Tab. 5.8 ; Abb. 5.11 A). Die korrekte Integration in das *leu1* Gen auf Chromosom II wurde durch ein ca. 2,3 kb langes PCR Fragment bestätigt. In der Westernanalyse wurde das Signal für HA-Prp1p bei 104 kD sichtbar (Stamm 514).

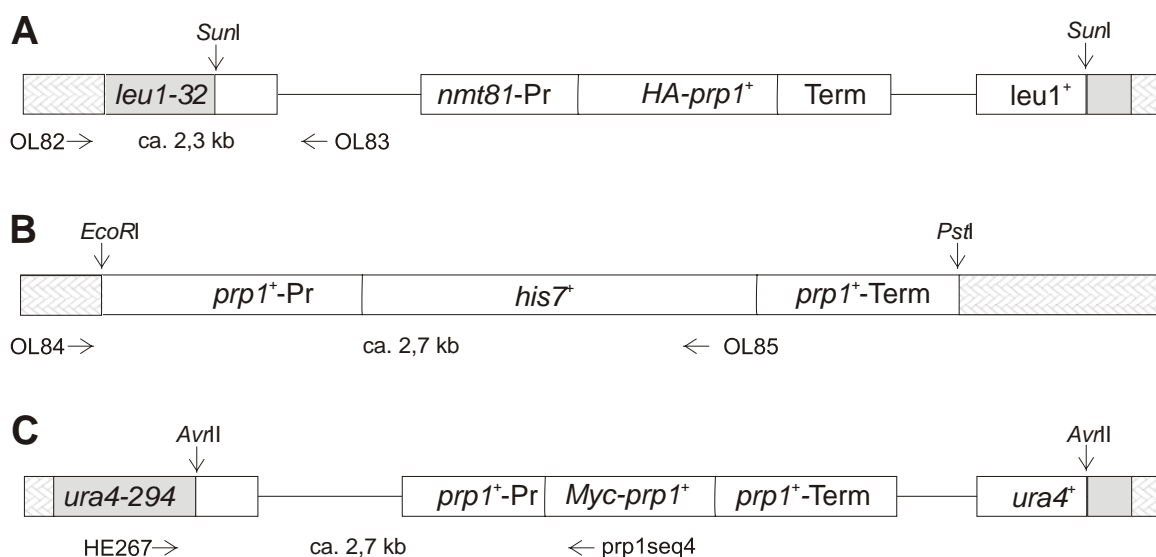
Um das endogene *prp1*<sup>+</sup> Gen mit einem Myc-Epitop zu fusionieren, wurde das offene Leseraster von *prp1*<sup>+</sup> auf Chromosom II mit dem *his7*<sup>+</sup> Gen aus *S. pombe* unterbrochen und anschließend das *Myc-prp1*<sup>+</sup> Allel in den *ura4* Locus auf Chromosom III integriert. Dazu wurde in einem zweiten Schritt pUC19*prp1-flank/his7*<sup>+</sup> (Konstruktssammlung Arbeitsgruppe Käufer, genetisches Institut; TU Braunschweig) mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Es wurden zwei 2,7 kb lange Fragmente erhalten. Das eine Fragment, besitzt das *his7*<sup>+</sup> Gen mit 900 bp des *prp1*<sup>+</sup> Promotorbereichs und hinter dem *his7*<sup>+</sup> Gen 680 bp der 3' UTR von *prp1*<sup>+</sup> (Abb. 5.11 B). Das zweite Fragment ist der linearisierte Vektor. Das *EcoRI* / *PstI* Fragment wurde in den Stamm 514 (Tab 5.3) transformiert und auf Transformanten selektiert, die Histidin prototroph waren. Bei erfolgreicher Genunterbrechung wird das *HA-prp1*<sup>+</sup> Gen nur transkribiert, wenn kein Thiamin dem Medium zugesetzt wird. Da *prp1*<sup>+</sup> ein essentielles Gen ist, ist kein Teilungswachstum mit Thiamin möglich. Deshalb wurde nach Histidin prototrophen Transformanten gesucht, die in Anwesenheit von Thiamin nicht wachsen können und bei Abwesenheit von Thiamin HA-Prp1p exprimieren. Zusätzlich wurde die Gen-Unterbrechung mittels PCR überprüft. Die Primer (Tab. 5.8; Abb. 5.11 B) binden zum einen vor dem integrierten Konstrukt an der genomischen DNA oberhalb des *prp1*<sup>+</sup> Gens (OL84) und zum anderen im Konstrukt am 3' Ende des *his7*<sup>+</sup> Gens (OL85) [Beckmann, 2000]. Die erfolgreiche Gen-Unterbrechung von *prp1*<sup>+</sup> durch *his7*<sup>+</sup> wurde durch ein 2,7 kb langes PCR Fragment bestätigt (Stamm 522).

Durch eine dritte Transformation wurde das *Myc-prp1*<sup>+</sup> Gen in den *ura4* Locus integriert. Dazu wurde das Konstrukt pUR19 $\Delta$ *ars* *Myc-prp1*<sup>+</sup> (Abb. 5.4) mit *AvrII* im *ura4*<sup>+</sup> Gen linearisiert und in den *ura4* Locus von Stamm 522 (Tab. 5.3) integriert.

Die Integration in den *ura4* Locus wurde durch PCR und mittels Westernanalyse mit anti-Myc Antikörpern überprüft. Ein Primer (HE267) für die PCR Reaktion ist komplementär zu einer Sequenz im 3' Bereich des *ura4-294* Gens und der andere (*prp1seq4*) zu Sequenzen im N-Terminus von *prp1*<sup>+</sup> (Tab.5.8; Abb. 5.11 C). Die erfolgreiche homologe Rekombination des pUR19 $\Delta$ *ars* *Myc-prp1*<sup>+</sup> Konstruktes in den *ura4* Locus wurde mit einem ca. 2,7 kb langen PCR Produkt bestätigt. In der Westernanalyse wurde für Myc-Prp1p ein Signal bei 104 kD erhalten (Stamm 523).

**Tab. 5.8** PCR Primer für die Konstruktion von Stamm 523 mit zwei Epitop fusionierten *prp1*<sup>+</sup>-Allelen

Bezeichnung	Sequenz
OL82	5' GCT CCA GGA TAC TTG TAT ATT TCG TTA AA 3'
OL83	5' CGT TTA CAA TTT CCT GAT GCG GT 3'
OL84	5' CCG AGA CAT TAA AAG ACA AAC GTA GTG G 3'
OL85	5' GAA CCT TGT GTG GGC TTG CAT ATA TAA C 3'
HE267	5' AGA GAA GCT GGT TGG AAG GC 3'
prp1seq4	5' GCC AAA CAT CCT CAG AGC GAG 3'



**Abb. 5.11** Schematische Darstellung der schrittweisen Konstruktion von Stamm 523. **A** Integration in den *leu1* Locus von *S. pombe* Chromosoms II. Das Konstrukt *pSZE**nm*81-*HA**prp1*<sup>+</sup> wurde mit *Sun*I linearisiert und in den mutierten genomischen *leu1* Locus integriert (grau unterlegt). Die Pfeile markieren die Lage der PCR Primer OL82 und OL83. Bei erfolgreicher Integration wird ein PCR Fragment von etwa 2,3 kb erhalten. **B** *prp1*<sup>+</sup> Genunterbrechung mit dem *his7*<sup>+</sup> Allel. Das *Eco*RI/*Pst*I Fragment wurde über homologe Rekombination in den *prp1*<sup>+</sup> Locus integriert. Die Pfeile markieren die Lage der PCR Primer OL84 und OL85. Bei korrekter Integration entsteht ein PCR Fragment von 2,7 kb. **C** Integration in den genomischen *ura4* Locus von *S. pombe*. Das Konstrukt *pUR19*Δ*arsMyc-prp1*<sup>+</sup> wurde mit *Avr*II linearisiert und in den mutierten genomischen *ura4* Locus integriert. Bei erfolgreicher Integration wird mit den Primern HE267 und *prp1*seq4 ein PCR Produkt von ca. 2,7 kb erhalten (Pfeile).

## 5.7 DNA Methoden

### 5.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode [Mülhardt, 2003].

500 mL LB Medium wurden mit 5 mL einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,7 wurden die Bakterien 10 Minuten bei 4500 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 150 mL TFB I (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v), 30 mM KOAc [pH 5,8], 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 mL TFB II (10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v)) aufgenommen und in 500 µL Aliquots bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA-Lösung wurde mit 200 µL Zellen versetzt und 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 mL LB Medium wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden 3 Minuten bei 8000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und auf einer LB Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 5.7.2 Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli*

#### Plasmid Mini-Präparation [nach Gatermann et al., 1988]

Fünf mL LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit den Zellen einer *E. coli* Kolonie angeimpft und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Vier mL der Kultur wurden bei 13000 Upm für eine Minute sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen im restlichen Medium vollständig gelöst. Nach Zugabe von 300 µL STET Puffer (8% Saccharose (w/v), 5% Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA, 0,5 mg/mL Lysozym) wurden die Zellen vorsichtig gemischt und 1 Minute im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und das Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 300 µL Isopropanol ausgefällt und 5 Minuten bei 13000 Upm präzipitiert. Die DNA wurde mit 400 µL 70% Ethanol gewaschen, in der Speedvac kurz getrocknet und in 50 µL TE gelöst.

### Plasmid Midi-Präparation

Bis zu 100 µg Plasmid DNA lassen sich mit dem Nucleobond AX 100 Kit der Firma Machery & Nagel aus einer 50 mL *E. coli* Kultur isolieren. Die Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### 5.7.3 Transformation von *S. pombe*

Für die Transformation von *S. pombe* wurden 100 mL EMM mit einer exponentiell wachsenden Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,07 bis 0,09 angeimpft und 18 Stunden bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/mL bei 5000 Upm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment 2x mit je 25 mL sterilem Aqua bidest und 1x mit TE/LiOAc (1 x TE; 0,1M LiOAc; frisch aus sterilen Stammlösungen ansetzen) gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^9$  Zellen/mL in dem gleichen Puffer eingestellt und 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Pro Transformation wurden 100 µL Zellen mit 10 µL frisch gekochter Heringsperma-DNA [10 µg/µL] in Reaktionsgefäße pipettiert. Für die Transformation von Plasmiden wurden 0,5 – 2,0 µg Plasmid-DNA, für die Integration in das *S. pombe* Genom bis zu 10 µg der linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. 500 µL PEG/TE/LiOAc (40% PEG (3500); 1 x TE; 0,1 M LiOAc; frisch angesetzt) wurden zugegeben und weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen 2x gemischt. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen 20 Minuten bei 42°C inkubiert, anschließend für 15 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 100 µL sterilem Aqua bidest resuspendiert, auf Selektionsmedium ausplattiert und für mehrere Tage bei 25°C bzw. 30°C inkubiert.

### 5.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pombe*

Chromosomale DNA aus *S. pombe* wurde in Anlehnung an das Protokoll von Hoffmann und Winston [1987] isoliert. Es wurden 5 mL EMM mit *S. pombe* Zellen angeimpft und 24 Stunden unter schütteln bei 25°C inkubiert. Von der dicht bewachsenen Kultur wurden 4 mL entnommen und bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden 1x mit Aqua bidest gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µL Puffer 1 (2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl [pH

8,0], 1 mM EDTA), 200 µL PCIA und 0,3 g Glasperlen ( $\phi$  5 mm) wurden die Proben 4 Minuten gründlich gemischt. Nach Zugabe von 200 µL TE wurde für 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit PCIA extrahiert, mit 96% Ethanol ausgefällt und sofort zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400 µL TE und 3 µL RNase A [10 mg/mL] gelöst und zum Verdau der RNA 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde mit 400 µL PCIA extrahiert, mit 10 µL 4 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 1 mL 96% Ethanol ausgefällt und 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die getrocknete DNA wurde in 30 µL TE gelöst.

### **5.7.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung doppelsträngiger DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen MBI Fermentas, Gibco BRL und New England Biolabs (NEB). Die Restriktion von 1 µg DNA erfolgte mit 1 U Enzym. Bei der Restriktion von DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (5.7.2) wurde einem 10 µL Ansatz 0,1 µg RNase A zugefügt. Die Reaktionsbedingungen wurden vom Hersteller übernommen und die Ansätze für eine Stunde inkubiert.

### **5.7.6 Ligation von DNA**

Die Ligation von Vektor- und DNA-Fragment erfolgte mit der T4-Ligase (NEB, MBI Fermentas). Sie wurde in einem Endvolumen von 20 µL mit 0,1 – 0,2 µg Vektor-DNA und 1 U Ligase durchgeführt. Bezogen auf die Konzentration der Enden wurden Vektor und DNA in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14,8°C (Fermentas) oder 30 Minuten bei 25°C (Quick Ligase; NEB).

### **5.7.7 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese**

DNA Fragmente wurden in Abhängigkeit von ihrer Länge in 0,7– 1,5 % Agarosegelen aufgetrennt, und durch Zugabe von 0,5 µg/mL Ethidiumbromid im Gel unter UV Licht sichtbar gemacht. Die Proben wurden vor dem Laden mit 1/6 Volumen Ladepuffer (50% Glycerin (v/v), 10 mM EDTA [pH 8,0] 0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% Xylene cyanole (w/v) in 1 x TBE) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (89 mM Tris-Borat [pH 8,3], 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte für 30 bis 60 Minuten bei 100 V. Je nach erwartetem Fragment wurden unterschiedliche Größenstandards ( $\lambda$ -DNA, low range ladder, high range ladder; Firma MBI-Fermentas) auf das Gel aufgetragen.

### **DNA Fragmentisolierung aus Agarosegelen**

Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN wurden DNA Fragmente aus Agarosegelen eluiert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **5.7.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen thermostabilen Polymerasen gearbeitet. Die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Fermentas) wurde zur Amplifikation von DNA Abschnitten für die Herstellung von Konstrukten, die in *S. pombe* exprimiert werden sollten, eingesetzt. Aufgrund ihrer "proof-reading" Aktivität zeichnet sie sich durch eine besonders geringe Fehlerrate aus. Alle anderen PCR Reaktionen wurden mit der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Fermentas) durchgeführt.

### **5.7.9 Sanger Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Methode des basenspezifischen Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide nach Sanger *et al.* [1977]. Die Sequenzreaktion wurde mit dem Cycle-Sequencing Kit der Firma Perkin Elmer Applied Biosystem durchgeführt. Zur Endmarkierung der DNA Fragmente werden 4 verschiedene fluoreszenzmarkierte 2', 3' Didesoxynukleotide eingesetzt, wodurch die Sequenzreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des ABI Prism<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer werden die Farbstoffe im Verlauf der Elektrophorese an einer definierten Position im Sequenzgel durch einen Laserstrahl angeregt und die emittierte Fluoreszenz durch spezielle Detektoren registriert.

Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 10 µL durchgeführt. Es wurden 2 µL Premix (dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, Puffer), 2 µL 5 x Puffer, 5 pmol Primer, 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt und 25 PCR-Zyklen durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 40 µL Aqua bidest, 5 µL 3M Na-Acetat [pH 5,3], 1 µL Dextranblau [20 mg/mL] und 125 µL Ethanol ausgefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 12,5 µL TSR-Puffer (template suppression reagent) gelöst und für 2 Minuten auf 90°C erhitzt. Der Ansatz wurde in Sequenziergefäße überführt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.



## 5.8 RNA Methoden

### 5.8.1 Solution Hybridisation

Der Nachweis der spleißosomalen U-snRNA erfolgte nach der Methode von Li und Brow [1993]. Nach Hybridisierung der RNA mit einer komplementären radioaktiven Sonde wird das Hybrid auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt.

Für den Nachweis der spleißosomalen U-snRNA in nativen Gradientenfraktionen wurden 10 µL jeder Fraktion mit 50 µL SHS Puffer (50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 8.0], 0.1% SDS, 1mg/mL Proteinase K) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden 1x mit PCIA extrahiert und 45 µL der RNA Lösung mit 0,1 pmol <sup>32</sup>P markierten spezifischen U1, U2, U5, U6 Oligonukleotiden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNA Lösung wurde mit 6 x Gelladepuffer (10 mM EDTA [pH8.0], 50% Glycerol (v/v), 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylen Cyanol,) versetzt und die Proben auf einem nativen Polyacrylamidgel (9%; 30:1) in 0.5 x TBE bei 5 W und 4°C aufgetrennt. Das Gel wurde zur Fixierung der RNA 10 Minuten in 7% Essigsäure inkubiert, anschließend auf Whatman Papier gelegt und auf dem Geltdrockner getrocknet. Zum Nachweis der RNA wurde das Gel auf einem Röntgenfilm exponiert.

### 5.8.2 Markierung der Oligonukleotide für die Solution Hybridisation

Zur Markierung der Sonden wurden je 10 pmol Oligonukleotid (Tab. 5.9) mit 20 µCi γ[<sup>32</sup>P] ATP und 10 U T4 Kinase (USB) für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die markierten Oligonukleotide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit aufgereinigt. In die Solution Hybridisation Reaktion wurde je 0,25 µl der U1, U2, U5 und U6 spezifischen Sonde eingesetzt.

**Tab. 5.9** Sequenz der U-snRNA spezifischen Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
snu1(1-26)	5' GCT GCA GAA ACT CAT GCC AGG TAA GT 3'
snu2(35-55)	5' GAA CAG ATA CTA CAC TTG ATC 3'
snu4(71-92)	5' GTT GGA GCG GTC AGG GTA ATA G 3'
snu5(77-107)	5' GAT TAC AAA AAC TAT ACA GTC AAA TTA GCA C 3'
snu6(18-40)	5' CTC TGT ATC GTT TCA ATT TGA CC 3'

### 5.8.3 RNA Isolierung aus *S. pombe*

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll von Nitscht *et al.* [1986]. Aus einer wachsenden *S. pombe* Kultur wurden 30 mL entnommen und für 5 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 2 mL Aqua bidest gewaschen. Das Zellsediment wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 200  $\mu\text{L}$  LETS-Puffer 1 % LiDS (0,1 M LiCl; 0,01 M Tris-HCl pH 7,4; 0,01 M EDTA; Lithiumsalz in 1% LiDS) und mit 200  $\mu\text{L}$  LETS-Puffer 0,2% LiDS aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen im Dismembrator (FastPrep) bei 4,5 m/sec für 30 Sekunden. Die Proben (1) wurden sofort auf Eis gestellt, mit 400  $\mu\text{L}$  PCIA versetzt und 20 Sekunden gründlich gemischt. Anschließend wurde für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge mit 13000 Upm bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Reaktionsgefäß (2) überführt und erneut mit 400  $\mu\text{L}$  PCIA extrahiert. Die aufgeschlossenen Zellen (1) wurden mit 400  $\mu\text{L}$  LETS-Puffer 0,2% LiDS re-extrahiert und 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand aus dem Reaktionsgefäß (2) wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß (3) pipettiert und mit 400  $\mu\text{L}$  PCIA extrahiert. Der Überstand aus dem Reaktionsgefäß (1) wurde zur PCIA-Phase im Reaktionsgefäß (2) gegeben und extrahiert. Die Extraktion der Proben wurde solange fortgesetzt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Zuletzt wurden die Überstände vereinigt und die RNA mit 0,011 M LiCl und 2,5 fachem Volumen Ethanol [96%] auf Eis gefällt. Die RNA wurde 20 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 Upm präzipitiert, mit 78% Ethanol gewaschen und zuletzt getrocknet. Zur photometrischen Bestimmung der RNA Konzentration wurde das Präzipitat in 30  $\mu\text{L}$  TE aufgenommen.

### 5.8.4 Auftrennung von RNA im Agarosegel

Die Gesamt-RNA von *S. pombe* wurde nach Nischt *et al.* [1986] in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose werden in 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [pH 6,5] durch Kochen gelöst, und nach Abkühlen auf  $60^{\circ}\text{C}$  wurden 6 % Formaldehyd und 30  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid hinzugefügt). 30  $\mu\text{g}$  RNA wurden mit 15  $\mu\text{L}$  Denaturierungspuffer (250  $\mu\text{L}$  Formamid; 75  $\mu\text{L}$  Formaldehyd [37%]; 5  $\mu\text{L}$  0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [pH 6,5]; 45  $\mu\text{L}$  Aqua bidest) versetzt und für 15 Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und zur Elektrophorese mit 5  $\mu\text{L}$

Probenpuffer (30% Glycerin (v/v); 0,03 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [pH 6,5]; 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Die RNA wurde für 4 bis 6 Stunden bei 100 V aufgetrennt.

### 5.8.5 Northern Blot

Die RNA wurde mindestens 16 Stunden aus dem Agarosegel auf Nylonmembranen übertragen. Dazu wurde eine Glasplatte auf eine Schale, die mit 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-Natriumcitrat [pH 7,0]) gefüllt war, gelegt. Auf die Glasplatte wurden zwei Streifen 3MM Whatman Papier übereinander gelegt, sodass die Enden in den Puffer tauchten. Das Agarosegel wurde auf die feuchten Whatman Papiere gelegt. Die Nylonmembran wurde aufgelegt und mit 3 Lagen 20 X SSC getränktem und 3 Lagen trockenem Whatman Papier abgedeckt. Darauf wurde ein Stapel aus saugfähigem Papier gelegt und mit einem Gewicht beschwert.

Die Membran wurde zur Fixierung der RNA 2 Stunden bei 80°C getrocknet.

### 5.8.6 Radioaktive Markierung von DNA

DNA Fragmente wurden mit dem Amersham Biosciences Random Prime Labelling System nach dem Protokoll des Herstellers mit  $\alpha[^{32}\text{P}]$  dCTP markiert. Dabei werden nach der random priming Methode Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz an denaturierte DNA angelagert und dienen so als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit von der markierten DNA abgetrennt. Für die Hybridisierung wurde die DNA-Sonde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert.

### 5.8.7 Hybridisierung der RNA

Die Nylonmembran mit der fixierten RNA wurde 3 Stunden bei 37°C in einer Vorhybridisierungslösung (6 x SSC; 0,2% Ficoll; 0,2 % Polyvinylpyrrolidin; 0,2 % BSA; 1 % SDS; 0,1 mg/mL denaturierte Kalbsthymus-DNA) inkubiert. Für die Hybridisierung mit der spezifischen Sonde wurde die Membran in die Hybridisierungslösung (6 x SSC; 1% SDS; 0,1 mg/mL denaturierte Kalbsthymus-DNA; 30-50 % Formamid; radioaktive Sonde) überführt. Die Inkubation erfolgte 16 Stunden bei 37°C. Zur Entfernung nicht gebundener Sonde wurde die Membran mehrmals gewaschen (10 bis 0,1 x SSC; 0,2% SDS). Die Membran wurde in Zellophan eingepackt und 1 bis 3 Tage bei -80°C auf einem Röntgenfilm exponiert.

## 5.9 Biochemische Methoden

### 5.9.1 Native Proteinextraktion aus *S. pombe*

Zur Isolierung der Gesamtproteine aus *S. pombe* [Moreno *et al.*, 1991] wurden die Zellen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 geerntet. Sie wurden 3 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert, mit 1 mL Stopp-Puffer (0,15 M NaCl; 0,05 M NaF; 0,01 M EGTA; 0,001 M NaN<sub>3</sub>; [pH 8,0]) gewaschen und das Zellsediment in 200 µL HB Puffer (0,025 M MOPS [pH 7,2]; 0,015 M EGTA; 0,015 M MgCl<sub>2</sub>; 0,05 M NaCl; 0,06 M β-Glycerophosphat; 0,001 M DTT; 0,1 mM NaVO<sub>3</sub>; 0,0125 g/L Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 0,4 g Glasperlen versetzt und im Dismembrator (FastPrep) 2x 20 Sekunden, mit einer 5 Minuten langen Zwischenkühlung auf Eis, bei 6,5 m/sec zertrümmert. Der Zellaufschluss wurde in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt, die Zelltrümmer und Glasperlen 2x mit HB Puffer extrahiert und alle Überstände in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Der Zellaufschluss wurde bei 13000 Upm (4°C) 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aserviert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (5.9.2) wurde er bei -80°C gelagert.

### 5.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Verfahren beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G 250 von  $\lambda = 465$  zu  $\lambda = 595$ , infolge einer Komplexierung mit Proteinen [Bradford *et al.*, 1995].

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde eine Standardkurve mit BSA (bovine serum albumin) von 1 bis 10 mg/mL erstellt. Die Standardproben wurden in einem Endvolumen von 20 µL in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, 980 µL 1:5 verdünntes und filtriertes Bradfordreagenz (0,1 g (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 50 mL 96 % Ethanol; 100 mL konzentrierte Phosphorsäure; 50 mL Aqua bidest) zugegeben und die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteinextrakte wurden diese 1:1 und 1:3 verdünnt eingesetzt und durch Vergleich mit den Werten der Kalibriergeraden deren Konzentration ermittelt.

### 5.9.3 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte mit der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli *et al.*, 1970]. Das Gel bestand aus einem 4 % Sammelgel

(2,3 mL Aqua bidest; 0,94 mL 4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris [pH 6,8]; 0,4% SDS); 0,5 mL Acryamidstammlösung, 30%; 20 µL APS 20 % (w/v); 4 µL TEMED) und aus einem 7,5 % Trenngel (4,2 mL Aqua bidest; 2,1 mL 4 x Trenngelpuffer (1,5 M Tris [pH 8,8]; 0,4% SDS); 2,1 mL Acryamidstammlösung, 30%; 42 µL APS 20 % (w/v); 6 µL TEMED). Die Proteinextrakte wurden mit 2 x SDS Ladepuffer (0,1 M Tris HCl [pH 6,8]; 4% (w/v) SDS; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % Glycerin (v/v); 0,2 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt, 3 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert, kurz anzentrifugiert und auf das Sammelgel aufgetragen. Bei 100 V wurden die Proteine im Sammelgel aufkonzentriert und anschließend bei 150 V im Trenngel aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x Glycinpuffer (0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,1% (w/v) SDS; [pH 8,3]), als Größenstandard wurde der Prestained Protein Marker Broad Range der Firma BioLabs aufgetragen.

### 5.9.4 Western Blot

Bei einem Western Blot wird eine Proteinmischung nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrocellulose übertragen. Die aufgetrennten Proteine werden durch spezifische Antikörper identifiziert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte nach der semi-dry Methode mit einem Gerät der Firma Phase GmbH. Der Aufbau erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Transfer der Proteine wurde bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 60 Minuten (1 mm Gel) oder 90 Minuten (1,5 mm Gel) durchgeführt.

Der Proteinnachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Zur Absättigung wurde die Membran 1 Stunde in blocking reagenz (10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (0,025 M Tris HCl [pH 8,0]; 0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl); 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>) inkubiert. Sie wurde 2x mit TBS gewaschen und danach eine Stunde in der ersten Antikörperlösung (Verdünnung in TBS siehe unten) inkubiert. Die Membran wurde 2x mit TBS gewaschen, eine Stunde mit dem sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert und zuletzt 2x 20 Minuten in TBS-0,05 % Tween gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL detection system der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE nach Herstellerangaben. Folgenden Antikörper wurden eingesetzt:

- HA.11 monoklonaler IgG Antikörper aus der Maus (Fa. BAbCO); 1:1000
- c-myc 9E10 monoklonaler IgG Antikörper aus der Maus (Fa. BAbCO); 1:1000
- TAT1 (Tubulin  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) monoklonaler IgG Antikörper aus der Maus (Dr. A. Baines; University of Manchester, UK); 1:1500

- Cdc2 (Y100) monoklonaler IgG Antikörper aus der Maus (Dr. C Norbury; University of Oxford, UK); 1:1000
- anti-mouse IgG Peroxidase gekoppelter Antikörper aus dem Schaf (AMERSHAM LIFE SCIENCE); 1:1500

### 5.9.5 Immunpräzipitation mit ProteinA Sepharose (PAS)

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurde der Antikörper an ProteinA Sepharose (PAS) gebunden. Pro Ansatz wurden 0,005 g PAS in 50 µL HB Puffer (siehe 5.9.1) eine Stunde bei Raumtemperatur oder 4°C über Nacht inkubiert. Die gequollene PAS wurde 2x mit HB Puffer gewaschen und in 30 µL HB Puffer mit 2% BSA und 0,0125 g Proteolyseinhibitor aufgenommen. Nach Zugabe von 6 µg Antikörper wurde der Ansatz für mindestens 4 Stunden bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit HB Puffer entfernt. Die Antikörper beladene PAS wurde in 30 µL HB Puffer mit 0,0125 g Proteolyseinhibitor aufgenommen und zu 10 mg Proteinextrakt gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 2 Stunden bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Danach wurde er bei 7000 Upm (4°C) für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Kontrolle aufbewahrt. Das Präzipitat wurde 2x mit Waschpuffer (0,15 M NaCl; 0,01 M Tris HCl [pH 7,5]; 0,05 % NP40) gewaschen. Für den Nachweis der Co-Immunpräzipitation zweier Proteine oder den Nachweis von snRNA in den Immunpräzipitaten wurde die Probe beim zweiten Waschschriff geteilt. Für den Nachweis von snRNA in den Immunpräzipitaten wurde das Präzipitat in 50 µL SHS Puffer (5.8.1) inkubiert. Für den Proteinnachweis mittels Westernblot wurden die Präzipitate in 20 µL 2 x SDS Ladepuffer (5.9.3) aufgenommen und in einem denaturierenden SDS Gel aufgetrennt.

### 5.9.6 Glycerolgradientenzentrifugation

10 mg Gesamtproteinextrakt wurden auf einen 11 mL 10 – 30 % Glycerolgradienten (0,025 M MOPS [pH 7,2]; 0,015 M EGTA; 0,015 M MgCl<sub>2</sub>; 0,05 M NaCl; 0,06 M β-Glycerophosphat; 0,001 M DTT; 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>, 0.04% NP40) geladen und 15 Stunden bei 24500 Upm und 4°C in einem SW41 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Manuell wurden 23 Fraktionen zu je 500 µL von oben nach unten abgenommen. Zum Nachweis von Cdc5p im Westernblot wurden von jeder Fraktion 15 µL eingesetzt. Zum Nachweis von Prp1p und Prp31p wurden die Fraktionen mit Aceton zur

Konzentrierung der Proteine ausgefällt (5.9.7). Zur Eichung des Glycerolgradienten wurden Katalase (11S), sowie bakterielle (30S, 50S) und eukaryotische (60S) Ribosomenuntereinheiten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

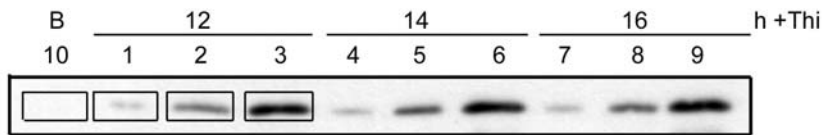
### 5.9.7 Acetonfällung von Proteinen

Für den Nachweis von Prp1p und Prp31p in den Gradientenfraktionen mittels Westernblot war es nötig die Proteine zu konzentrieren. Es wurden 200 µL jeder Fraktion mit 200 µL PCIA versetzt und 15 Sekunden gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase zusammen mit der Interphase in 1 mL kaltem Aceton bei -20°C ausgefällt. Die Proteine wurden bei 13000 Upm präzipitiert und mit 1 mL 70% Alkohol gewaschen. Das Sediment wurde in der Speedvac getrocknet und in 50 µL 1 x SDS Ladepuffer gelöst.

### 5.10 Densitometrische Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mit der Quantity One software der Firma BioRad (Version 4.5.2). Die Auswertung wird am Beispiel der Cdc2p Kinase beschrieben:

*S. pombe* Zellen des Stammes 470 (Tab. 5.3) wurden je 12, 14 und 16 Stunden in Medium mit Thiamin inkubiert. Gesamtextrakt wurden isoliert, je drei verschiedene Konzentrationen (Abb. 5.12) mittels SDS PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Blots wurden zuerst mit anti-Cdc2 aus der Maus und anschließend mit HPR markiertem anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL Kit der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE. Für die Exposition des Films sollte die Expositionszeit nicht zu lange gewählt werden, sodass die Signale nicht zu intensiv werden. Der Film wurde eingescannt (Abb. 5.12) und mit der Quantity One Software nach der „Background Subtraction Method“ ausgewertet. Dazu wurde um jedes Signal ein Rechteck gleicher Größe gelegt und über das Programm „Volume Analysis“ die Pixel jedes Rechtecks berechnet (Tab. 5.10; Adj. Volume INT\*mm<sup>2</sup>). Die Konzentrationen über den gemessenen Zeitraum wurden auf den 12 Stundenwert bezogen, der als 100% angenommen wurde (Tab. 5.10; %INT). Die errechneten Werte wurden mit Hilfe des Microsoft Excel Programms graphisch dargestellt.



**Abb. 5.12** Westernblot von Cdc2p. Aufgetragen wurden 30 µg (Spur 1, 4, 7), 60 µg (Spur 2, 5, 8) und 90 µg (Spur 3, 6, 9) Gesamtextrakt von Zellen des Stammes 470, die 12, 14 und 16 Stunden (h) in Medium mit Thiamin inkubierten. Für die Auswertung mit der Quantity One Software wurde um jedes Signal ein gleich großes Rechteck gelegt. Spur 10: B, blank.

**Tab. 5.10** Quantity One Protokoll der ausgewählten Rechtecke nach der „Background Subtraction Method“. Index, entspricht den Spuren 1-10 in Abbildung 5.12. In der dritten Spalte (Volume INT\*mm<sup>2</sup>) sind die vom Programm errechneten Pixel pro Rechteck eingetragen. In der vierten Spalte wurde der Hintergrund (Blank) subtrahiert. In der letzten Spalte wurde der relative Anteil an Cdc2p nach 14 und 16 Stunden bezogen auf den 12 Stunden Wert berechnet.

Index	Name	Volume INT*mm <sup>2</sup>	Adj. Vol. INT*mm <sup>2</sup>	%INT
1	30µg/12h	257.96	172.04	100
2	60µg/12h	662.90	525.23	100
3	90µg/12h	1176.67	1090.74	100
4	30µg/14h	255.69	169.76	98
5	60µg/14h	632.66	546.74	105
6	90µg/14h	1196.96	1111.04	101
7	30µg/16h	255.65	169.73	98
8	60µg/16h	632.40	546.48	105
9	90µg/16h	1207.32	1127.13	103
10	Blank	80.19	0.00	

### 5.11 Gerichtete Mutagenese von *prp1*

Die gerichtete Mutagenese der *prp1*-cDNA wurde mit dem MutaGene M13 *in vitro* Mutagenese Kit 2 der Firma BioRad nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Nach dem Verfahren von Kunkel *et al.* [1987] ermöglicht dieser Kit die gezielte Mutagenese einer DNA Sequenz mit Hilfe des Bakteriophagen M13.

Für die Mutagenese wurde das Konstrukt M13mp18-*prp1*<sup>+</sup> verwendet (Abschnitt 5.5.4). Das offene Leseraster der *prp1*-cDNA liegt in der Orientierung von *EcoRI* (ATG) nach *HindIII* (TGA) vor. Deshalb wurden die Oligonukleotide für die Mutagenese vom kodierenden Strang der cDNA Sequenz abgeleitet. Damit sich die Mutationen leichter nachweisen lassen, wurde bei der Auswahl der Oligonukleotide



darauf geachtet, dass durch die Mutagenese neue Restriktionsschnittstellen in der *prp1*-cDNA entstehen oder vorhandene mutiert wurden. Die Sequenzen der Oligonukleotide mit den eingefügten/mutierten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 5.11 angegeben.

**Tab. 5.11** Oligonukleotide für die gezielte Mutagenese der *prp1*-cDNA. (1) eingefügte und (2) zerstörte Restriktionsschnittstelle. Die mutierten Nukleotide sind unterstrichen.

Oligo	Sequenz	Schnittstelle
prp1(T26/29/30A)	5' CGT GGT GCA <u>GCA</u> GGA TTT <u>GCA</u> <b>GCG CGT</b> TCA G 3'	<i>MluI</i> (2)
prp1(T244A)	5' G GGG TAT TTA <b>GCT AGT</b> CTG AAT AG 3'	<i>SpeI</i> (2)
prp1(T232/236/244A)	5' CG AAT TTG <u>GCT</u> TCA CCA TCG <u>GCT</u> ATA GAT CCG AAG GGG TAT TTA <b>GCT AGT</b> CTG AAT AG 3'	<i>SpeI</i> (2)
prp1(T197/199/205/207A)	5' CT CAA GCA <b>GGC GGC</b> GAA <u>GCT</u> CCA GAT ATG AAT GGG <u>GCA</u> AAA <u>GCA</u> AAT TTT GTT G 3'	<i>EheI</i> (1)
prp1Δ1-41	5' GAA GGT CGA CGT CCC AAG AAT CTA TAA 3'	-
prp1Δ25-56	5' GTA GCA GGT TTA GGA CGT GGT ATA GAG GAA GAA GAA GAT ATC G 3'	-
prp1Δ78-107	5' GAC ATT GAA GTA GCG CTG TTT CGT GAA AAA CAA GAA CAG CTA C 3'	-
prp1Δ126-161	5' GAA AAA TAT GAA AAA GAA AAC CCC AAG CAG CCG AGA CGT GAA AGA TTT TAT GC 3'	-
prp1Δ170-208	5' CGA GAC GTG AAA GAT TTT ATT TTG TTG AAA TTG GAG CTG C 3'	-
prp1Δ227-249	5' GTT TTA GGT ATC AAG TTA GCA CAA GTT CCA AAA AAT GCC AAT GAC C 3'	-

Die Oligonukleotide wurden einzeln oder, um mehrere Mehrfachmutationen zu erzeugen in Kombination eingesetzt. M13mp18-Konstrukte mit erfolgreich gesetzten Mutationen in der *prp1* cDNA wurden als template für weitere Mutageneseansätze verwendet. Die mutierte *prp1* cDNA wurde sequenziert und in den Vektor pQE31 umklontiert.

## 5.12 Aufreinigung von in *E. coli* exprimierten Proteinen

### 5.12.1 Expression und Aufreinigung von Prp4p

Für die Expression von GST-Prp4p wurde eine Vorkultur von DH5α mit pGEX-6p-*prp4*<sup>+</sup> 15 Stunden in LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C inkubiert. Mit 10 mL der Vorkultur wurden 490 mL LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und für 2 Stunden bei

37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 500 µL IPTG wurde die Expression von GST-Prp4p induziert und die Zellen für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert und die Zellen 1x mit 1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; [pH 7,4]) gewaschen. Erfolgte die Proteinisolierung nicht sofort, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Die geernteten Zellen wurden in 1,5 mL Lysis-Puffer (TBS, 12,5 mg Proteaseinhibitor, 1 mg/mL Lysozym, 5 µL/mL RNaseA [10mg/mL], 5 µL/mL DNase [10mg/mL]) aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 5x 10 Sekunden dauernde Ultraschallstöße von 100 W. Zwischen den Ultraschallstößen wurden die Proben 30 Sekunden auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden 20 Minuten bei 13000 Upm und 4°C abgetrennt. Zum geklärten Proteinextrakt wurden 600 µL Glutathion-Sepharose pipettiert und für 45 Minuten bei 4°C drehend inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose mit der gebundenen Prp4p-Kinase wurde 3x mit je 1 mL PBS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) DTT, 3x mit je 1 mL 50 mM Tris-HCl [pH 7,5] und 1x mit 1 mL Cleavage-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,0]; 150mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) gewaschen. Die Sepharose wurde in 600 µL Cleavage-Puffer aufgenommen und die gebundene Prp4p-Kinase durch Zugabe von 15 µL PreScission™-Protease von der Sepharose abgespalten. Dazu wurde die Probe 4 Stunden bei 4°C im Rotationsmischer inkubiert. Die Prp4p-Kinase wurde mittels Ultrafiltration („Vivaspin 0,5 mL Concentrator, 10000 MWCO“ Ultrafiltrationssäulen; Fa. Sartorius) in Kinasepuffer umgepuffert und gleichzeitig 3-fach konzentriert. Aliquotes des umgepufferten, konzentrierten Proteins wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

### 5.12.2 Expression und Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Prp1p

Für die Expression von His<sub>6</sub>-Prp1p in *E. coli* wurde das Plasmid pQE31prp1 in den Stamm M15[pREP4] transformiert. Von diesem Stamm wurde eine Vorkultur in LB Medium mit Ampicillin und Kanamycin angesetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit der Vorkultur (50 mL) wurden 450 mL LB Medium mit Ampicillin und Kanamycin angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde auf 17°C abgekühlt, und die His<sub>6</sub>-Prp1p Produktion durch Zugabe von 0,5 mL 1 M IPTG induziert. Anschließend wurde die Kultur 16 Stunden bei 17°C inkubiert. Die Zellen

wurden 20 Minuten bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert, 1x mit 1 x Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300mM NaCl) gewaschen und zuletzt in 4 mL Lysis-Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300mM NaCl; 10 mM Imidazol) und 12,5 mg Proteaseinhibitor, 1 mg/mL Lysozym, 10 µL/mL RNaseA [10mg/mL], 5 µL/mL DNase [10mg/mL]) aufgenommen und 30 Minuten auf Eis gestellt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 5x 10 Sekunden dauernde Ultraschallstöße von 100 W. Zwischen den Ultraschallstößen wurden die Proben 30 Sekunden auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden 20 Minuten bei 13000 Upm und 4°C abgetrennt. Der geklärte Proteinextrakt wurden mit 2 mL Ni-NTA-Agarose versetzt und 30 Minuten bei 4°C im Rotationsmischer inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde in eine Elutionssäule überführt und mit je 30 mL Lysispuffer und Waschpuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300mM NaCl; 20 mM Imidazol) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min gewaschen. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit 4 mL Elutionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300mM NaCl; 250 mM Imidazol) von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Vermutlich aufgrund der zahlreichen TPR-Motive am C-Terminus von Prp1p, die zur Ausbildung von Protein/Protein-Interaktionen führen, war es nicht möglich, das Protein nach der Ultrafiltration zurückzugewinnen. Deshalb wurden His<sub>6</sub>-Prp1p mittels Dialyse umgepuffert und mit PEG konzentriert.

### **Umpuffern von His<sub>6</sub>-Prp1p mittels Dialyse**

Proteinlösungen können mittels Dialyse entsalzt und umgepuffert werden. Das His<sub>6</sub>-Prp1p Eluat wurde dazu in einen Dialyseschlauch gegeben, der zuvor in einer 1 mM EDTA-Lösung aufgeköcht worden war. Die Dialyse erfolgte gegen 360 mL 5 mM HEPES [pH 7,4] mit KOH bei 4°C. Der Dialysepuffer wurde mehrmals ausgetauscht. Die Gesamtzeit der Dialyse betrug mindestens 8 Stunden.

### **Konzentrierung von His<sub>6</sub>-Prp1p mittels Polyethylenglycol (PEG)**

Der Dialyseschlauch mit dem umgepufferten His<sub>6</sub>-Prp1p wurde mit pulverisiertem PEG4000 bedeckt und bei 4°C so lange gelagert, bis das PEG die Hälfte der Flüssigkeit aus der Proteinlösung absorbiert hatte. Es war nicht möglich, His<sub>6</sub>-Prp1p über 0,2 mg/mL zu konzentrieren, da das Protein bei höheren Konzentrationen in der Lösung ausfiel.

### 5.13 Kinaseassay

Die Kinaseassays wurden in einem Volumen von 20 µL durchgeführt. Sie enthielten Kinasepuffer (10 x Kinasepuffer: 200 mM HEPES [pH 7,4] mit KOH; 30 mM MgCl<sub>2</sub>; 50% (v/v) Glycerin; 5 mM DTT), 5µCi [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP, 100 µM ATP, 2 µg His<sub>6</sub>-Prp1p und 1 µg Prp4p-Kinase. Die Proben wurden 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Kinase-reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL 2 x Probenpuffer und 2 Minuten kochen im Wasserbad gestoppt. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, bevor die freien, radioaktiven Nukleotide in den Puffer gelangten. Der untere Teil des Gels mit der Bromphenolbande wurde abgetrennt und der obere Teil des Trenngels auf Nitrocellulose übertragen. Der Nachweis des phosphorylierten Prp1p erfolgte mittels Autoradiographie.

### 5.14 Phosphopeptidmap von Prp1p

Mit Hilfe eines Phosphopeptidmaps lässt sich die Anzahl phosphorylierter Peptide eines Proteins abschätzen. Die Analyse wurde nach dem Protokoll von van der Geer *et al.* [1993] durchgeführt. Die phosphorylierte Bande von Prp1p wurde aus der Nitrocellulose ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit 0,5% Polyvinylpyrrolidon in 100 mM Essigsäure gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abpipettiert und die Membran 5x mit je 1 mL Aqua bidest und 2x mit je 1 mL frisch hergestellter 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 150 µL der frisch hergestellten 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung überschichtet, der 15 µL Chymotrypsin [1 mg/mL] zugefügt wurden. Die Probe wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, noch 1x 15 µL Chymotrypsin hinzugegeben und erneut für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µL Aqua bidest zugefügt und 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der Speedvac bei 4°C getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden in 50 µl Perameisensäure (9 Teile Ameisensäure (95-100%), 1 Teil 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aufgenommen und eine Stunde auf Eis oxidiert. Dadurch sollte das Auftreten von Oxidationsisomeren während der chromatographischen Auftrennung verhindert werden. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 400 µL Aqua bidest hinzugegeben, und die Proben in der Speedvac getrocknet. Die Peptide wurden in 300 µL Aqua bidest gewaschen, und erneut getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden in 7,5 µL pH 1,9 Puffer (50 mL Ameisensäure [88%]; 156 mL Eisessig; 1794

mL Aqua bidest) aufgenommen. Je 0,5  $\mu$ L Aliquots wurden schrittweise auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Vor dem nächsten Auftragungen sollte die Probe vollständig getrocknet sein. Die Celluloseplatte wurde mit pH 1,9 Puffer angefeuchtet und die Peptide 40 Minuten bei 1 kV aufgetrennt. Die Platte der Elektrophoreseapparatur wurde während des Laufs auf 16°C gekühlt. Nach dem Lauf wurde die Celluloseplatte getrocknet und um 90° gedreht in einen Chromatographietank mit Phosphochromatographiepuffer (750 mL n-Butanol; 500 mL Pyridin; 150 mL Eisessig; 600 mL Aqua bidest) gestellt. Die Chromatographie wurde abgebrochen, wenn die Laufront ca. 2 cm unterhalb der oberen Kante der Dünnschichtcelluloseplatte angekommen war. Die Platte wurde zum Abdampfen des Puffers unter dem Abzug getrocknet. Die phosphorylierten Peptide wurden autoradiographisch sichtbar gemacht.

## 6 Literatur

Alahari S.K., Schmidt H., Käufer N.F. (1993). The fission yeast *prp4<sup>+</sup>* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucl. Acid. Res.* **21**: 4079-4083

Bähler J., Wu J.Q., Longtine M.S., Shah N.G., McKenzie III A., Steever A.B., Wach A., Philippsen P., Pringle J. (1998). Heterologous Modules for Efficient and Versatile PCR-based Gene Targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951

Barbet N., Muriel W.J., Carr A.M. (1992). Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**: 59-66

Basi G., Schmid E., Maundrell K. (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promotor affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**: 131-136

Beckmann C. (2000). Gerichtete Mutagenese des *prp1* Gens aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* und Charakterisierung der Mutationen *in vivo*. Diplomarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig

Blatch G.L., and Lässle M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* **21**: 932-939

Bottner C.A., Schmidt H., Vogel S., Michele M., Käufer N.F. (2005). Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* **48(3)**: 151-161

Brow D.A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 333-60

Burge C.B., Tuschl T.H., Sharp P.A. (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In *The RNA World II*, 2<sup>nd</sup> edn (ed Gesteland R.F., Cech T.R., Atkins J.F.), pp 525-560. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Carnahan R.H., Feoktistova A., Ren L., Niessen S., Yates J.R., Gould K.L. (2005). Dim1p is required for efficient splicing and export of mRNA encoding Lid1p, a component of the fission yeast anaphase-promoting complex. *Eukaryotic Cell* (2005). **4(3)**: 577-587

Chan S.H., Kao D.I., Tsai W.Y., Chen S.C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* **302(5643)**: 279-82

Chan S.P. and Chen S.C. (2005). The Prp19p-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J Biol Chem.* **280(35)**: 31190-9

Chen C.H., Yu W.C., Tsao T.Y., Wang L.Y., Chen H.R., Lin J.Y., Tsai W.Y., Cheng S.C. (2002). Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucl. Acid Res.* **30**: 1029-1037

Chen D., Toone M.S., Mata J., Lyne R., Burns G., Kivinen K., Brazma A., Jones N., Bähler J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol.* **14**: 214–229

Craven, R.A., Griffiths, D.J.F., Sheldrick, K.S., Randall, I.M.H., Carr, A.M. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**: 59-68

Dellaire G., Makarov E.M., Cowger J., Longman D., Sutherland H.G.E., Lührmann R., Torchia J., Bickmore W.A. (2002). Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **22 (14)**: 5141-56

Egel, R. (1971). Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta* **98**: 89-96

Gatermann K.B., Rosenberg G.H., Käufer N.F. (1988). Double stranded sequencing, using mini prep plasmids. *Biotechniques* **6**: 7

van der Geer, P., Luo. K., Sefton, B.M., Hunter, T. (1993). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis on cellulose thin-layer plates. In *Protein Phosphorylation - A Practical Approach series*, 2<sup>nd</sup> edn (ed. Hardie, D.G.), pp 97-126. Oxford University Press

Görnemann, J., Kotvic K.M., Hujer K., Neugebauer K.M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol. Cell.* **19**: 53-63

Grainger R.J. and Beggs J.D. (2005). Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA* **11**: 533-557



Groß T., Lützelberger M., Wiegmann H., Klingenhoff A., Shenoy S., Käufer N.F. (1997). Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucl. Acid. Res.* **25**: 1028-1035

Gutz H., Heslot, H., Leupold U., Loprieno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. In *Handbook of Genetics*, (ed King, R.C.), Vol. 1 Plenum Press, New York, 395-446

Hanks S.K. and Hunter T. (1995). Protein kinases. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**: 573-596

Hanks S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily a perspective. *Genome Biology* **4(5)**: III

Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272

Huang T., Vilardell J., Query C.C. (2002). Pre-spliceosome formation in *S. pombe* requires a stable complex of SF1-U2AF<sup>65</sup>-U2AF<sup>23</sup>. *EMBO.* **21**: 5516-5526

Jahnknecht R., de Martynoff, G., Lou, J.; Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G.; (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged proteins expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8972-8976

Jurica M.S. and Moore M.J. (2003). pre-m-RNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* **12**: 5-14

Kameoka S., Duque P., Konarska M.M. (2004). p54<sup>nrb</sup> associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *EMBO Journal*. **23**: 1782-1791

Käufer N.F. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik. TU Braunschweig

Kojima T, Zama T, Wada K, Onogi H, Hagiwara M. (2001). Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J Biol Chem*. **276(34)**: 32247-56.

Kuhn A.N., Käufer N.F. (2002). Mechanism and control of pre-mRNA splicing. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* (ed Egel, R.), pp 353-368. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Kuhn A.N., Käufer N.F. (2003). Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*. **42**: 241-251

Kunkel T.A., Roberts, J.D., Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*. **154**: 367-382

Lacadie S.A. and Rosbash M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5' splice site base pairing in yeast. *Mol. Cell*. **19**: 65-75

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Laggerbauer B., Achsel T., Lührmann R. (1998). The human U5-200kD DEXH-box protein unwinds U4/U6 RNA duplexes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **95**: 4188-4192

Lamb J.R., Tugendreich S., Hieter P. (1995). Tetra-trico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *TIBS* **20**: 257-259

Leupold, U. (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* **24**: 381-480

Li Z., Brow D.A. (1993). A rapid assay for quantitative detection of specific RNAs. *Nuc. Acid Res.* **21(19)**: 4645-4646

Makarov E.M., Makarova O.V., Achsel T., Lührmann R. (2000). The human homologue of the yeast splicing factor Prp6p contains multiple TPR elements and is stably associated with the U5 snRNP via protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **298**: 567-575

Makarov E.M., Makarova O.V., Urlaub H., Gentzel M., Will C.L., Wilm M., Lührmann R. (2002). Small Nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*. **298**: 2205-2208

Makarova O.V., Makarov E.M., Liu S., Vornlocher H.P., Lührmann R. (2002). Protein 61K, encoded by a gene (PRP31P) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6•U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **21(5)**: 1148-1157

Makarova O.V., Makarov E.M., Urlaub H., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Lührmann R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to step 1 of splicing. *EMBO J.* **23**: 2381-2391

Malca H., Shomron N., Ast G. (2003). The U1 snRNP base pairs with the 5' splice site within a pent-snRNP complex. *MCB* **:23(10)** 3442-3455

Maniatis T. and Reed R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**: 499-506

Manley J.L., Tacke R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* **10**:1569-1579

Mayes A.E., Potashkin J.A., Beggs J.D. (2000). Splicing pre-mRNA introns. In *The yeast nucleus - Frontiers in Molecular biology*, (ed Fantes P. and Beggs J.), pp. 246-275. Oxford University press.

McDonald W.H., Ohi R., Smelkova N., Friendewey D., Gould K.L. (1999). Myb-Related Fission Yeast cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. (1999). *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5352-5362

Moreno, S., Klar, S., Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* **194**: 795-823

Mühlhardt, C. (2003). Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. *Spektrum-Akademischer Verlag*.

Newman A. (2001). Molecular biology: RNA enzymes for RNA splicing. *Nature* **413**: 695-696

Newo Soufo A.N. und Käufer N.F. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik. TU Braunschweig

Nilsen T.W. (2005). Spliceosome assembly in yeast: one ChIP at a time? *Nature Struc. & Mol. Biol.* **12(7)** 571-573

Nischt, R., Thuroff, E., Käufer, N.F. (1986). Molecular cloning of a ribosomal protein gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* **10(5)**: 365-370

van Nues R.W. and Beggs J.D., (2001). Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 1451-1467

Ohi M.D., Link A.J., Ren L., Jennings J.L., McDonald W.H., Gould K.L. (2002). Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-Related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2011-2024

Preker P.J. and Keller W. (1998). The HAT helix, a repetitive motif implicated in RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 15-16

Ragunathan P.L., Guthrie C. (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEAH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol.* **8**: 847-855

Raska I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* **96(8)**: 579-94

Richert K., Schmidt H., Groß T, Käufer N. F. (2002). The deubiquitinating enzyme Ubp21p of fission yeast stabilizes a mutant form of protein kinase Prp4p. *Mol Genet Genomics* **267**: 88-95

Richert K. (2002). Untersuchungen zur Aufklärung des prä-mRNA Spleißvorgangs in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*: genetische und biochemische Charakterisierung der Interaktionen des *prp4* Gens. Dissertation, Institut für Genetik, TU Braunschweig

Rosenberg G.H., Alahari S.K., Käufer N.F. (1991). *prp4* from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 305-309

Rustici G., Mata J., Kivinen K., Lio P., Penkett C.J., Burns G., Hayles J., Brazma A., Nurse P. and Bähler J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nature genetics* **36(8)**: 809-817

Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Sanger, F., Nicklens, S., Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**: 5463-5467

Schaffert N., Hossbach M., Heintzmann R., Achsel T., Lührmann R. (2004). RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J.* **23(15)**: 3000-3009

Schmidt H., Richert K., Drakas R.A., Käufer N.F. (1999). *spp42*, identified as a classical suppressor of *prp4-73*, which encodes a kinase involved in pre-mRNA splicing in fission yeast, is a homologue of the splicing factor Prp8p. *Genetics* **153**: 1183-1191

Schwelnus W., Richert K., Opitz F., Groß T., Habara Y., Tani T., Käufer N.F. (2001). Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO.* **2**: 35-41

Schwelnus W. (2004). Untersuchungen zur Interaktion von Prp4p-Kinase und dem Spleißfaktor Prp1p. Dissertation, Institut für Genetik, Technische Universität Braunschweig.

Schwelnus W. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik. TU Braunschweig

Sharp P. (1994). Split Genes and RNA Splicing. *Cell* **77**: 805-815

Sontheimer E.J. (2001). The spliceosome shows its metal. *Nature structural biology*. **8**: 11-13

Staley J.P. and Guthrie C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**: 315-326

Stevens S.W., Ryan D.E., Ge H.Y., Moore R.E., Young M.K., Lee T.D., Abelson J. (2002). Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal pentanucleotide small nuclear ribonucleoprotein. *Mol Cell* **9**: 31-44

Tarn W.Y., Lee K. R., Cheng S.O. (1993). The Yeast PRP19 protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol. Cell Biol.* **13**: 1883-1891

Urushiyama S., Tani T., Ohshima Y. (1996). Isolation of novel pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* **253**: 118-127

Urushiyama S., Tani T., Ohshima Y. (1997). The *prp1<sup>+</sup>* Gene Required for Pre-mRNA Splicing in *Schizosaccharomyces pombe* Encodes a Protein That Contains TRP Motifs and Is Similar to Prp6p of Budding Yeast. *Genetics.* **147**: 101-115

Valadkhan S. and Manley J.L. (2001). Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* **413**: 701-707

Voges F.M. und Käufer N.F. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik. TU Braunschweig

Zock-Emmenthal S. Persönliche Mitteilung. Institut für Genetik. TU Braunschweig



## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung

Die Westernblot Signale wurden wie in Abschnitt 5.10 beschrieben ausgewertet. Die errechneten Werte sind in den folgenden Tabellen eingetragen. Stabw; Standardabweichung von drei Versuchen.

#### 7.1.1 Stamm AK038 und AK057 (Abb. 3.13)

##### Myc-Prp1p (AK057)

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	102	92	5,5	5,1
16	99	76	3,5	9,2
18	99	55	7	4,5
20	101	49	4	3,6

##### HA-Prp31p (AK038)

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	108	93	5,2	7,4
16	105	78	11,5	5,1
18	98	63	5,5	1,6
20	102	46	4,6	4,5

##### HA-Cdc5p (AK057)

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	103	100	14,8	1,4
16	104	75	7,1	2,4
18	106	65	7,1	5,4
20	103	51	9,9	3,1

##### Cdc2p (AK057)

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	101	101	8,3	5,5
16	99	98	8,7	8,5
18	104	84	4,2	4,6
20	101	67	7	4

##### $\alpha$ -Tubulin (AK057)

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	102	103	8,3	5,5
16	97	104	8,7	8,5
18	101	80	4,2	4,6
20	102	66	7	4

**7.1.2 Stamm 425 (Abb. 3.20)****Prp31p**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	107	105	11,8	6,1
16	103	100	4,6	2,3
18	99	75	10,1	4
20	106	58	10	5,5

**Cdc2p**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	104	100	5,6	4,6
16	103	100	4,2	2,9
18	107	81	6,6	5,3
20	105	65	4,2	5,6

 **$\alpha$ -Tubulin**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	101	99	5,5	1,7
16	99	101	2	2
18	104	72	3	5,5
20	101	57	6,1	13

**7.1.3 Stamm 453 und 470 (Abb. 3.25)****Prp1p (470)**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	102	122	5,5	4
16	106	140	5,1	5,5
18	101	159	2,5	6,1
20	104	173	4,5	6

 **$\Delta$ NPPrp1p (453)**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	105	110	2,3	7
16	99	102	4,9	7,4
18	104	93	6,4	3,6
20	102	69	3,9	5,9

**Prp31p (453)**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	107	105	11,8	6,1
16	103	100	4,6	2,3
18	99	75	10,1	4
20	106	58	10	5,5

**Cdc2p (453)**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	104	100	5,6	4,6
16	103	100	4,2	2,9
18	105	81	6,6	5,3
20	107	65	4,2	5,6

 **$\alpha$ -Tubulin (453)**

Zeit [Stunden]	ohne Thiamin	mit Thiamin	ohne Thi+/-Stabw	mit Thi+/-Stabw
12	100	100	0	0
14	101	99	5,5	1,7
16	99	101	2	2
18	104	72	3	5,5
20	101	57	6,1	11

## 7.2 Aminosäuresequenz von Prp1p

Aminosäuresequenz des Proteins Prp1p aus *S. pombe* (GenBank acc. No. D83743).

```

1  MANFYPDFLN MQPPPNYVAG LGRGATGFTT RSDLGPAQEL PSQESIKAAI  50
51 EQRKSEIEEE EDIDPRYQDP DNEVALFATA PYDHEDEEAD KIYQSVEEHL 100
101 SKRRKSQREK QEQLQKEKYE KENPKVSSQF ADLKRGLSTL TDEDWNNIPE 150
151 PGDLTRKKRT KQPRRERFYA TSDFVLASAR NENQAISNFA VDTQAGTETP 200
201 DMNGTKTNFV EIGAARDKVL GIKLAQASSN LTSPSTIDPK GYLTSLSNSMV 250
251 PKNANDLGDI RKARKLLQSV IETNPKHASG WVAARLEEV ANKLSQAQSL 300
                                     TPR1
301 ILKGCENCSR SEDVWLEAIR LHPAAEAKVI IANAVKKLPK SVTLWLEAEK 350
                                     TPR2                               TPR3
351 LENQAQHKKR IIKKALEFNP TSVSLWKEAV NLEEEVDNAR ILLARAVELI 400
                                     TPR4
401 PMSIDLWLAL ARLETYENAK KVLNKARQTI RTSHEVWIAA ARLEEQQGNV 450
                                     TPR5                               TPR6
451 SRVEKIMARG VSELQATGGM LQDQWLSEA EKCETEGAVI TAQAIINTCL 500
                                     TPR7
501 GVGLDEEDQF DTWLDDAQSF IARKCIDCAR AVFAFSLRVY PKSEKLWLRA 550
                                     TPR8                               TPR9
551 VELEKLYGTT ESVCSSILEKA VESCPKAEIL WLLYAKERKN VNDIAGARNI 600
                                     TPR10
601 LGRAFEYNSN SEEIWLAAGR IEFVNNENER ARKLLARARI ESGTERIWTK 650
                                     TPR11                               TPR12
651 SISLERILDE KDRAQLLEN ALKIYPHYDK LYMMKGQIFE DKEQIELARD 700
                                     TPR13
701 AYLAGTKVCP YSIPLWLLA KLEEKQSVIR ARVVFDRKAV KNPKNFLWL 750
                                     TPR14                               TPR15
751 ELIKMELRAG NISQVRAALA KALQECPSG LLWTEAIWLE PRAQRKTRAT 800
                                     TPR16
801 DALRKCEGNA HLLCTIARML WLEKKADKAR SWFLKAVKAD QDNGDVWCWF 850
                                     TPR17                               TPR18
851 YKYSLEAGNE DQQKEVLTSF ETADPHHGYF WPSITKDIKN SRKTPQELLH 900
                                     TPR19
901 LAINVL

```